

**Isolierung, Charakterisierung und Lokalisierung  
der ATP-Synthasen der archaeellen Genera  
*Ignicoccus* und *Nanoarchaeum***



**DISSERTATION**

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von  
**Lydia Juliane Kreuter**

aus Starnberg

im Jahr 2014







Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 13.11.2014

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Reinhard Rachel

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. R. Wirth  
1. Gutachter: Prof. Dr. R. Rachel  
2. Gutachter: Prof. Dr. V. Müller  
3. Prüfer: Prof. Dr. C. Ziegler

Unterschrift:









**Für meinen Vater, Dr. med. Bernhard Kreuter,  
und meinen Opa, Dr. med. Franz Kreuter,  
die diese Arbeit leider nie werden lesen können.**







# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Material und Methoden .....	11
2.1	Verwendete Substanzen und Materialien .....	11
2.1.1	Chemikalien, Biochemikalien und Lösungsmittel.....	11
2.1.2	Gase .....	12
2.1.3	Molekularmassenstandards .....	12
2.1.4	Reaktionskits, Membranen und Filtereinheiten .....	13
2.1.5	Indikatoren für physiologische und zellbiologische Untersuchungen .....	13
2.1.6	Antikörper.....	13
2.2	Sterilisation.....	14
2.3	Mikroskopie .....	15
2.3.1	Lichtmikroskopie .....	15
2.3.2	Transmissionselektronenmikroskopie .....	15
2.4	Verwendete Organismen und Kultivierung.....	16
2.4.1	Verwendete Stämme.....	16
2.4.2	½ SME <i>Ignicoccus</i> Medium .....	16
2.4.2.1	Zusammensetzung (Huber et al., 2000; Paper et al., 2007) .....	16
2.4.2.2	Herstellung in Serumflaschen .....	16
2.4.2.3	Herstellung für Großanzuchten im Fermenter .....	17
2.4.3	Kultivierung .....	18
2.4.3.1	Kultivierung in Serumflaschen .....	18
2.4.3.2	Kultivierung im Fermenter .....	18
2.4.3.3	Zellernte nach Kultivierung im Fermenter.....	18
2.5	Zellaufschluss.....	19
2.5.1	Puffer .....	19
2.5.2	French Press .....	19
2.6	Membranpräparation.....	20
2.6.1	Differentielle Zentrifugation.....	20
2.6.2	Dichtegradienten-Zentrifugation .....	20
2.6.2.1	Herstellung der Auftragssuspension.....	20
2.6.2.2	Saccharosegradient.....	21
2.7	Solubilisierung .....	21
2.8	Chloroform/Methanol-Extraktion .....	22
2.8.1	Puffer und Lösungen .....	22
2.8.2	Durchführung .....	22
2.9	Chromatographische Enzymreinigung .....	23
2.9.1	Puffer .....	23
2.9.2	Säulen .....	24

2.9.3	Durchführung .....	24
2.10	Proteinfällung .....	25
2.10.1	Probenvorbereitung .....	26
2.10.2	Fällung mit PEG 6000 .....	26
2.11	Vernetzung und Fixierung von Proteinen .....	26
2.11.1	Crosslinking .....	27
2.11.2	GraFix .....	27
2.12	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	27
2.12.1	BCA-Test .....	27
2.12.2	Nanodrop 280 nm .....	28
2.13	Messung der Enzymaktivität .....	28
2.13.1	Nachweis der ATP-Hydrolyseaktivität .....	28
2.13.1.1	ATPase In-Gel-Assay .....	28
2.13.1.2	„Quicktest“, „Longtest“ und Hemmstofftest .....	29
2.13.1.2.1	Puffer und Lösungen .....	29
2.13.1.2.2	Durchführung .....	29
2.13.2	Nachweis der Hydrogenaseaktivität .....	31
2.13.2.1	Hydrogenase In-Gel-Assay .....	31
2.13.2.2	Qualitativer Hydrogenasenachweis .....	31
2.14	Gelelektrophoretische Verfahren .....	32
2.14.1	Gelelektrophorese .....	32
2.14.1.1	SDS-PAGE nach Lämmli, 1970 .....	32
2.14.1.1.1	Puffer .....	32
2.14.1.1.2	Durchführung .....	32
2.14.1.2	SDS-PAGE nach Schägger, 2006 .....	33
2.14.1.2.1	Puffer .....	33
2.14.1.2.2	Durchführung .....	33
2.14.1.3	Clear Native Elektrophorese (CNE) .....	34
2.14.1.3.1	Puffer .....	34
2.14.1.3.2	Durchführung .....	34
2.14.1.4	2D-Native/SDS-PAGE .....	35
2.14.2	Färben von Gelen .....	35
2.14.2.1	Coomassie-Färbung .....	35
2.14.2.2	Silberfärbung .....	36
2.14.2.2.1	Durchführung .....	36
2.14.2.2.2	Entfärben .....	37
2.15	Proteinidentifikation .....	37
2.15.1	Massenspektrometrische Methoden: MALDI-TOF MS/MS .....	37
2.15.2	Immunologische Methoden: Western-Blot .....	38
2.15.2.1	Wetblot .....	38
2.15.2.2	Dotblot .....	39
2.15.2.3	Immundetektion .....	39
2.15.2.3.1	Puffer und Lösungen .....	39
2.15.2.3.2	Durchführung .....	40
2.15.3	N-terminale Sequenzierung .....	40
2.16	Bioinformatische Analysen .....	41

3	Ergebnisse.....	42
3.1	Versuche zur Reinigung der ATP-Synthase/ATPase von <i>I. hospitalis</i> im Tris-Puffersystem bei pH 8,0 .....	42
3.1.1	Bestimmung der optimalen Ionenkonzentration.....	42
3.1.1.1	Einfluss der Ionenkonzentration auf die Aktivität .....	42
3.1.1.2	Einfluss der Ionenkonzentration auf die Stabilität .....	43
3.1.2	Reinigung der ATP-Synthase/ATPase .....	44
3.1.2.1	Saccharose-Dichtegradient .....	44
3.1.2.2	Chromatographische Reinigung und Analyse der Subkomplexe.....	45
3.1.2.3	Identifizierung von Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase.....	47
3.2	Versuche zur Reinigung des Gesamtkomplexes der ATP-Synthase/ATPase von <i>I. hospitalis</i> im AMPSO-Puffersystem bei pH 9,0 .....	49
3.2.1	Methodische Vorarbeiten .....	49
3.2.1.1	Saccharose-Dichtegradient .....	49
3.2.1.2	ATPase-Aktivitätstest und Hemmstofftest .....	49
3.2.2	Chromatographische Reinigung.....	52
3.2.2.1	Anionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie .....	52
3.2.2.2	Analyse der gereinigten Proteinkomplexe.....	54
3.2.2.3	Versuche zur Stabilisierung des Gesamtkomplexes .....	59
3.2.3	Reinigung durch Fällung mit PEG 6000 .....	61
3.2.3.1	Reinigung aus bei 90°C gezüchteten Zellen .....	61
3.2.3.2	Reinigung aus bei 75°C gezüchteten Zellen .....	65
3.3	Isolierung und Charakterisierung der Untereinheit c der ATP-Synthase/ATPase von <i>I. hospitalis</i> .....	67
3.3.1	Biochemische Analyse .....	67
3.3.2	Bioinformatische Analyse.....	68
3.4	Versuche zur Reinigung der ATP-Synthasen/ATPasen von <i>I. pacificus</i> und <i>I. islandicus</i> .....	69
3.4.1	Die ATP-Synthase/ATPase von <i>I. pacificus</i> .....	69
3.4.1.1	Interpretation der Genomdaten .....	69
3.4.1.2	Versuche zur Reinigung.....	69
3.4.2	Die ATP-Synthase/ATPase von <i>I. islandicus</i> .....	71
3.4.2.1	Interpretation der Genomdaten .....	71
3.4.2.2	Versuche zur Reinigung.....	72
3.4.3	Vergleich der ATP-Synthasen/ATPasen verschiedener <i>Ignicoccus</i> -Spezies .....	73
3.5	Versuche zur Reinigung und Charakterisierung der ATP-Synthase/ATPase von <i>N. equitans</i> .....	75
3.5.1	Versuche zur Reinigung der ATP-Synthase/ATPase von <i>N. equitans</i> im Tris-Puffersystem bei pH 8,0 .....	75
3.5.1.1	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation .....	76
3.5.1.2	Analyse der Membranproteine.....	76
3.5.1.3	Chromatographische Reinigung.....	78
3.5.1.4	Versuche zur Natriumionen-Abhängigkeit der ATP-Synthase/ATPase von <i>N. equitans</i> .....	80
3.5.2	Versuche zur Reinigung der ATP-Synthase/ATPase von <i>N. equitans</i> im HEPES-Puffersystem bei pH 7,0 .....	82
3.5.2.1	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation .....	83

3.5.2.2	Chromatographische Reinigung.....	83
3.5.2.3	Analyse der Membranproteine.....	85
3.6	Nachweis der Untereinheit c der ATP-Synthase/ATPase von <i>N. equitans</i> .....	87
3.6.1	Biochemische Analyse.....	88
3.6.2	Bioinformatische Analyse.....	89
4	Diskussion.....	90
4.1	Die ATP-Synthase/ATPase von <i>I. hospitalis</i> .....	90
4.2	Die ATP-Synthase/ATPase innerhalb der Gattung <i>Ignicoccus</i> .....	98
4.3	Die ATP-Synthase/ATPase von <i>N. equitans</i> .....	101
5	Zusammenfassung.....	106
6	Literaturverzeichnis.....	107
7	Anhang .....	116
A	Abkürzungsverzeichnis.....	116
B	Abbildungsverzeichnis.....	119
C	Tabellenverzeichnis.....	120
D	Auflistung relevanter Proteine aus <i>I. hospitalis</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. islandicus</i> und <i>N. equitans</i> .....	121
E	Daten aus Analysen mittels MALDI-TOF MS/MS .....	126
F	Publikationen .....	128
G	Danksagung.....	129







# 1 Einleitung

„All enzymes are beautiful, but the ATP synthase is one of the most beautiful as well as one of the most unusual and important.“

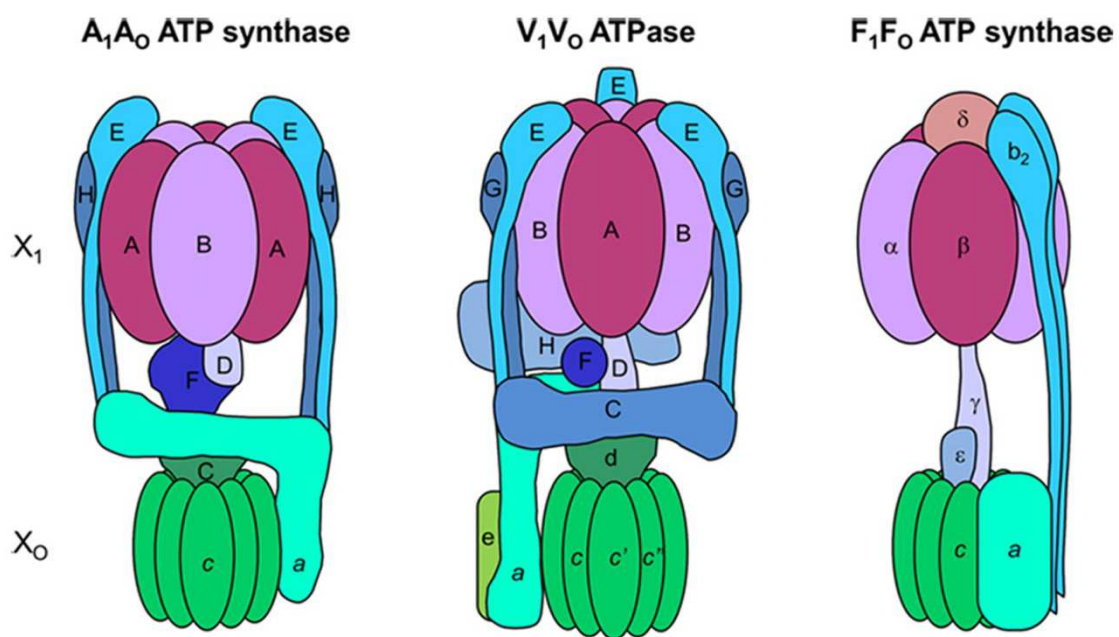
(Paul D. Boyer: The ATP synthase – a splendid molecular machine)

Die Schönheit dieses ATP synthetisierenden Enzyms liegt in seiner asymmetrischen dreidimensionalen Struktur. Ungewöhnlich ist es aufgrund seiner Komplexität und seines Reaktionsmechanismus. Als wichtig kann die ATP-Synthase allein aufgrund der Schätzung bezeichnet werden, dass ein aktiver Doktorand pro Tag mehr als sein/ihr Körpergewicht an ATP synthetisiert (Boyer, 1997). ATP (Adenosintriphosphat) wird aus ADP (Adenosindiphosphat) und anorganischem Phosphat gebildet und gilt als die universelle Energiewährung der Zelle (Ballmoos et al., 2009).

Die Bedeutung der ATP-Synthase/ATPase wird durch die Tatsache unterstrichen, dass sie in allen drei Domänen des Lebens (Woese et al., 1990) vorkommt und die jeweiligen Enzyme große strukturelle und funktionale Ähnlichkeit besitzen (Hilario & Gogarten, 1993). Grundsätzlich sind sie in der Lage, ATP sowohl zu synthetisieren als auch zu hydrolysieren. In der Domäne der *Bacteria* findet sich der sog. F-Typ von ATP-Synthasen/ATPasen, der in der Cytoplasmamembran der Bakterienzelle, aber auch in der inneren Mitochondrienmembran und in der Thylakoidmembran von Chloroplasten vorkommt (Capaldi & Aggeler, 2002). Bei den *Eukarya* gibt es die V-Typ ATPasen, die meist in intrazellulären Membranen wie bei Endosomen, Lysosomen, Vesikelabschnürungen des Golgi-Apparates oder sekretorischen Vesikeln, aber auch in der Cytoplasmamembran verschiedener Zelltypen (u.a. Nierenzellen, Osteoklasten und Makrophagen) lokalisiert sind und *in vivo* als ATP-getriebene Protonenpumpen fungieren (Cipriano et al., 2008). Innerhalb der *Archaea* finden sich dagegen ATP-Synthasen/ATPasen des A-Typs (Müller & Grüber, 2003). Es wird angenommen, dass sich die verschiedenen Typen der ATP-Synthasen/ATPasen aus einem gemeinsamen Vorgängerenzym entwickelt haben. Heute bilden sie separate Cluster, die gut mit der Einteilung der Organismen in die jeweiligen Domänen nach 16S rRNA-Genanalysen übereinstimmen. Es gibt jedoch Ausnahmen, die vermutlich durch horizontalen Gentransfer entstanden sind: Die Bakterien *Thermus thermophilus* und *Enterococcus hirae* besitzen ATP-Synthasen/ATPasen des A-Typs, wobei diese in *E. hirae* nur bei alkalischem pH-Wert zusätzlich zur F-Typ ATP-Synthase/ATPase exprimiert wird (Müller & Grüber, 2003). Bei den methanogenen Archaeen *Methanosarcina barkeri* und *Methanosarcina acetivorans* wurden zusätzlich zur A-Typ ATP-Synthase/ATPase Gene für ATP-Synthasen/ATPasen den F-Typs gefunden (Müller & Grüber, 2003; Saum et al., 2009). Zumindest für *M. acetivorans* konnte

allerdings durch Deletionsversuche gezeigt werden, dass der Mikroorganismus auch ohne diese Gene für eine  $F_1F_0$  ATP-Synthase/ATPase uneingeschränkt lebensfähig ist. Deren Zweck bleibt also unklar (Saum et al., 2009).

Schematische Abbildungen der Untereinheitenzusammensetzung der verschiedenen ATP-Synthase/ATPase-Typen verdeutlichen ihre strukturelle Ähnlichkeit (Abb. 1.1). Sie bestehen zum einen aus einem membrangebundenen  $F_0$ -/ $V_0$ -/ $A_0$ -Subkomplex, der als Ionenkanal fungiert, und zum anderen aus einem löslichen  $F_1$ -/ $V_1$ -/ $A_1$ -Subkomplex, der die katalytische Funktion der ATP-Synthase bzw. -Hydrolyse innehat. Verbunden sind die beiden Teile durch einen zentralen und einen oder zwei periphere Stiele (Grüber et al., 2001b; Müller & Grüber, 2003).



**Abb. 1.1 Modelle der drei verschiedenen ATP-Synthase/ATPase-Klassen (aus Mayer & Müller, 2013)**

Die Unterschiede zwischen den ATP-Synthase/ATPase-Typen beruhen in erster Linie auf einer variierenden Anzahl an akzessorischen Untereinheiten im Bereich des zentralen und peripheren Stiels. Während die F-Typ ATP-Synthase/ATPase lediglich einen peripheren Stiel aus einem Homodimer ( $b_2$ ) und einen zentralen Stiel aus einer einzigen Untereinheit  $\gamma$  besitzt, finden sich bei der V-Typ ATPase zwei periphere Stiele aus unterschiedlichen Untereinheiten sowie mehrere Untereinheiten, die am Aufbau des zentralen Stiels beteiligt sind (Abb. 1.1). Insbesondere die Untereinheiten C und H haben keine Homologe in bakteriellen oder archaeellen ATP-Synthasen/ATPasen (Müller et al., 2005b) und sind an dem für V-Typ ATPasen spezifischen Regulationsmechanismus durch reversible Dissoziation in Subkomplexe beteiligt (Kane & Smardon, 2003). In der A-Typ ATP-Synthase/ATPase sind sowohl Merkmale der F- als auch der V-Typ ATP-Synthasen/ATPasen zu finden. Einerseits zeigen insbesondere die katalytischen Untereinheiten große Sequenzhomologien zu denen

der V-Typ ATPase, andererseits sind die ATP-Synthasen/ATPasen des A-Typs in ihrer Funktion der ATP-Synthese mit denen des F-Typs vergleichbar (Schäfer & Meyering-Vos, 1992).

Zur Aufklärung der detaillierten Struktur der A-Typ ATP-Synthase/ATPase gab es in der Vergangenheit verschiedene Ansätze. Die Struktur einzelner Untereinheiten konnte mittels Röntgenkristallographie (Schäfer et al., 2006; Maegawa et al., 2006; Kumar et al., 2010; Balakrishna et al., 2010; Balakrishna et al., 2012) oder NMR Spektroskopie (Kish-Trier et al., 2008; Kish-Trier & Wilkens, 2009; Raghunathan et al., 2010; Gayen & Grüber, 2010) geklärt werden. Der  $A_1$ -Subkomplex konnte ebenfalls mittels Röntgenkristallographie (Grüber et al., 2001a) sowie im Elektronenmikroskop (Wilms et al., 1996; Coskun et al., 2004) strukturell untersucht werden. Eine kristallographische Analyse des  $A_0$ -Subkomplexes ist bis heute nicht gelungen (Lau & Rubinstein, 2011), jedoch konnte der c-Ring alleine detailliert untersucht werden (Murata et al., 2005; Meier, 2005; Toei et al., 2007). Es war auch schon mehrfach möglich, den gesamten ATP-Synthase/ATPase-Komplex im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen und so Aufschluss über dessen Struktur zu erhalten (Wilms et al., 1996; Lingl et al., 2003; Vonck et al., 2009; Lau & Rubinstein, 2011).

Insgesamt ergibt sich für eine typische  $A_1A_0$  ATP-Synthase/ATPase eine Untereinheitenstöchiometrie von  $A_3B_3CDE_2FH_2ac_x$  (Grüber et al., 2014). Der  $A_1$ -Subkomplex besteht aus jeweils drei Untereinheiten A und B, die abwechselnd zu einer pseudohexameren Struktur angeordnet sind (Müller & Grüber, 2003), welche einen Durchmesser von etwa 10 nm aufweist (Walker, 2013). Wie bei den V-Typ ATPasen ist die Untereinheit A die katalytisch aktive, die die Walker-Motive A und B für die Bindung von Nukleotiden enthält. Die Untereinheit B ist zwar auch fähig, Nukleotide zu binden, hat aber vor allem eine regulatorische Funktion (Grüber et al., 2014). Der zentrale Stiel besteht aus den Untereinheiten C, D und F (Abb. 1.1). Untereinheit D hat eine lange, linksgängige coiled-coil-Struktur und ragt in das Zentrum des A/B-Hexamers. Sie kann durch Crosslinker an die Untereinheit A gekoppelt werden, was auf eine enge Interaktion hindeutet (Coskun et al., 2002). Gemeinsam mit der Untereinheit F, die wiederum an Untereinheit B gekoppelt werden kann, bildet sie den Rotorschaft (Grüber et al., 2014). Untereinheit C, die eine trichterförmige Struktur aufweist, stellt eine Verbindung zwischen den Untereinheiten D/F und dem in die Membran eingebetteten c-Ring dar. Der D/F-Komplex ragt in den Trichter hinein, der mit seinem schmalen Ende den Kontakt mit dem c-Ring herstellt (Lau & Rubinstein, 2011). Die peripheren Stiele, von denen eine typische ATP-Synthase/ATPase des A-Typs zwei besitzt, bestehen aus jeweils einer Untereinheit E und H (Grüber et al., 2014). Eine Verbindung mit dem A/B-Hexamer erfolgt zwischen den Untereinheiten B und E (Lau & Rubinstein, 2011). Auf der gegenüberliegenden Seite ist keine der beiden Untereinheiten E oder H in der Membran verankert wie der periphere Stiel in der F-Typ ATP-Synthase/ATPase (Grüber et al., 2014). Vielmehr gehen sie eine Verbindung mit dem hydrophilen Teil der Untereinheit a (I) ein (Lau & Rubinstein, 2011). Die Untereinheit a bildet zusammen mit dem aus c (K)-Untereinheiten aufgebauten Ring den  $A_0$ -Subkomplex. Die N-terminale Domäne

der Untereinheit a ist hydrophil und bildet an der Membranninnenseite eine Art Kragenstruktur aus, die wie bereits erwähnt mit den Untereinheiten der peripheren Stiele verbunden ist (Grüber et al., 2014). Die C-terminale Domäne ist in die Membran eingebettet und besitzt in einer typischen archaeeellen ATP-Synthase/ATPase 7 – 8 Transmembranhelices. Gemeinsam mit dem c-Ring ist sie für die Ionentranslokation zuständig, wofür sie in unmittelbarem Kontakt mit zwei c-Untereinheiten steht (Grüber et al., 2014). Aufgrund der Tatsache, dass diese Kontaktstelle so klein ist, werden die beiden Komponenten vermutlich in erster Linie durch die peripheren Stiele zusammen gehalten (Lau & Rubinstein, 2011), die damit entscheidend zur Stabilität des Enzymkomplexes beitragen. Der N-terminale Bereich der c-Untereinheit ist hinsichtlich seiner Sequenz sehr variabel und kann unterschiedliche Funktionen erfüllen (Zhang et al., 2013). Der C-terminale Bereich dagegen ist stark konserviert und besteht bei vielen Archaeen aus zwei Transmembranhelices mit einer Ionenbindestelle, wie es von  $F_1F_0$  ATP-Synthasen/ATPasen bekannt ist. Bei *Methanothermobacter thermoautotrophicus* und einigen anderen Vertretern der Methanogenen jedoch hat eine c-Untereinheit vier Transmembranhelices mit zwei Ionenbindestellen, und bei den Gattungen *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Desulfurococcus*, *Staphylothermus* und *Ignisphaera* findet sich bei vier Transmembranhelices lediglich eine Bindestelle. Darüber hinaus gibt es beispielsweise bei *Methanocaldococcus jannaschii* und *Methanococcus maripaludis* c-Untereinheiten mit sechs Transmembranhelices und jeweils zwei Ionenbindestellen. Einen Extremfall stellt die c-Untereinheit von *Methanopyrus kandleri* dar, die aus 26 Transmembranhelices mit 13 Ionenbindestellen besteht (Müller et al., 2005b; Grüber et al., 2014). Es wird vermutet, dass diese speziellen Formen der c-Untereinheit durch Genduplikation bzw. -vervielfältigung und anschließende Fusion entstanden sind (Müller et al., 2005b).

Der Verlust einer Ionenbindestelle in einer c-Untereinheit mit vier Transmembranhelices wie beispielsweise bei *Pyrococcus furiosus* bedeutet, dass nur noch halb so viele Ionen transloziert werden können, was für die ATP-Synthese nicht mehr ausreichend wäre (Lau & Rubinstein, 2011; Mayer et al., 2012b). In diesem Fall konnte jedoch gezeigt werden, dass der c-Ring von *P. furiosus* aus zehn Monomeren besteht und somit deutlich größer ist als der einer typischen F-Typ ATP-Synthase/ATPase. Dies resultiert in einem Verhältnis von 3,3 Ionen pro ATP, welches für die ATP-Synthese ausreichend ist (Vonck et al., 2009; Mayer et al., 2012b).

Die Ionenbindestelle ist in der Regel spezifisch für  $H^+$ - oder  $Na^+$ -Ionen. Für die ATP-Synthase/ATPase von *Methanosarcina acetivorans* konnte jedoch gezeigt werden, dass sie sowohl  $H^+$ - als auch  $Na^+$ -Ionen binden und über die Membran transportieren kann (Schlegel et al., 2012). Die meisten ATP-Synthasen/ATPasen von Archaeen (und auch von Bakterien) sind protonenabhängig. Die Bindung erfolgt an einer konservierten Carboxylseitenkette der Aminosäure Glutamat oder Aspartat der Untereinheit c (Grüber et al., 2014). Die Bindung von  $Na^+$ -Ionen ist komplexer und wurde bei *P. furiosus* und *Ilyobacter tartaricus* detailliert

untersucht (Mayer et al., 2012b; Meier, 2005). Die Aminosäuren Glutamat/Glutamin in der einen Helix sowie Glutamat und Threonin/Serin in der benachbarten Helix gelten als minimale Voraussetzung und werden als  $\text{Na}^+$ -Bindemotiv bezeichnet (Grüber et al., 2014; Dimroth & Ballmoos, 2008). Dieses findet sich bei allen methanogenen und halophilen Archaeen sowie bei Vertretern der Gattungen *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Desulfurococcus*, *Ignisphaera*, *Staphylothermus* und *Nanoarchaeum* (Grüber et al., 2014).

Unabhängig davon, welches Ion gebunden wird, ist der Funktionsmechanismus der ATP-Synthase der gleiche. Ein Ion diffundiert von außen, der Seite mit der höheren Ionenkonzentration, in den Eintrittskanal, der von der Untereinheit a gebildet wird. Es neutralisiert die negative Ladung der Carboxylseitenkette an der Ionenbindestelle einer c-Untereinheit, so dass diese in den hydrophoben Bereich der Membran eintreten kann. Dafür gelangt an der anderen Seite der a/c-Kontaktstelle eine c-Untereinheit mit gebundenem Ion in den Bereich des Austrittskanals der Untereinheit a und das Ion verlässt die Bindestelle. Diese wird dann vermutlich durch eine konservierte Arginin-Seitenkette in der Untereinheit a stabilisiert (Dimroth & Ballmoos, 2008; Grüber et al., 2014). Die so angetriebene Rotation des c-Rings wurde durch Kopplung eines fluoreszierenden Actinmoleküls an die c-Untereinheit experimentell dargestellt (Pänke et al., 2000). Aufgrund der festen Verbindung des c-Rings mit dem zentralen Stiel ist dieser auch zur Rotation gezwungen, was ebenfalls mittels fluoreszierender Actinmoleküle veranschaulicht werden konnte, die an die Untereinheiten  $\gamma$  (Noji et al., 1997) bzw.  $\epsilon$  (Kato-Yamada et al., 1998) der bakteriellen ATP-Synthase/ATPase gekoppelt wurden. Während der ATP-Synthese wird die Rotationsgeschwindigkeit auf 100 – 150 Umdrehungen/s geschätzt (Walker, 2013). Untereinheit  $\gamma$  entspricht der Untereinheit D, die durch die Rotation innerhalb der hexagonalen Struktur des A/B-Komplexes Konformationsänderungen der katalytischen Untereinheiten hervorruft. Diese selbst werden durch die Verbindung mit den peripheren Stielen an der Rotation gehindert (Ballmoos et al., 2009). Die drei katalytischen Untereinheiten A befinden sich also in unterschiedlichen Konformationen, die im Modell des ‚binding change mechanism‘ als *loose*, *tight* und *open* bezeichnet werden. In ersterem Zustand werden ADP und Phosphat lose gebunden. Im *tight*-Zustand erfolgen eine feste Bindung und die Bildung von ATP durch Abspaltung von Wasser. Schließlich wird im *open*-Zustand ATP freigesetzt (Boyer, 1993). In umgekehrter Richtung funktioniert die ATP-Synthase/ATPase als Ionenpumpe, die unter Verbrauch von ATP einen Ionengradienten aufbaut. Es wird angenommen, dass dies die physiologische Funktion der ATP-Synthase/ATPase von *E. hirae* ist. Für die ATP-Hydrolyse des  $\text{A}_1$ -Subkomplexes wurde hier eine Rotationsgeschwindigkeit von etwa 73 Umdrehungen/s ermittelt. Die Rotation erfolgte in drei Schritten von jeweils  $120^\circ$  und ohne die von bakteriellen ATP-Synthasen/ATPasen bekannten Zwischenschritte (Minagawa et al., 2013). Dies weist auf einen bedeutenden Unterschied im Funktionsmechanismus der ATP-Synthasen/ATPasen des A-Typs und des F-Typs hin (Grüber et al., 2014).

Die meisten strukturellen Informationen über  $A_1A_0$  ATP-Synthasen/ATPasen stammen entweder aus Untersuchungen der Enzyme aus den Bakterien *T. thermophilus* (Lau & Rubinstein, 2011) und *E. hirae* (Arai et al., 2013) oder aus den Euryarchaeoten *P. furiosus* (Vonck et al., 2009) und *M. jannaschii* (Lingl et al., 2003). Über crenarchaeelle ATP-Synthasen/ATPasen ist dagegen wenig bekannt. Keiner der Versuche zur Reinigung des Enzyms aus *Sulfolobus acidocaldarius* (Wakagi & Oshima, 1985; Lübben & Schäfer, 1987), *Sulfolobus solfataricus* (Hochstein & Stan-Lotter, 1992) und *Pyrodictium abyssi* (Dirmeier et al., 2000) führte zur Anreicherung einer gekoppelten  $A_1A_0$  ATP-Synthase/ATPase. *Crenarchaeota* werden oft als die ursprünglichsten Vertreter der *Archaea* angesehen und umfassen viele hyperthermophile Organismen (Woese et al., 1990).

*Ignicoccus hospitalis*, der bislang einzige bekannte Wirt für *Nanoarchaeum equitans*, ist ein solcher Organismus. Er wurde aus einem Hydrothermalsystem bei Kolbeinsey Ridge (Island) isoliert und wächst optimal bei 90°C, 1,4 % NaCl und pH 5,5 mit einer minimalen Teilungsrate von 1 Stunde. Die Zellen von *I. hospitalis* sind kokkoid und haben eine Größe von 1 – 4 µm (Paper et al., 2007). Ihre Zellhülle besteht aus zwei Membranen und nicht, wie bei vielen anderen *Crenarchaeota*, aus einer Cytoplasmamembran und einem S-Layer (Paper et al., 2007; Rachel et al., 2002; Abb. 1.2). *I. hospitalis* hat Zellanhänge, die als Fibers bezeichnet werden, da sie sich deutlich von archaeellen Flagellen oder Fimbrien unterscheiden. Sie haben einen Durchmesser von 14 nm und eine Länge von bis zu 20 µm und bestehen aus dem Protein Igni\_0670 (Müller et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass die Fibers einen Typ IV-Pili-ähnlichen Aufbau besitzen (Yu et al., 2012) und über eine bislang einzigartige Struktur innerhalb der inneren Membran verankert sind (Meyer et al., 2014).

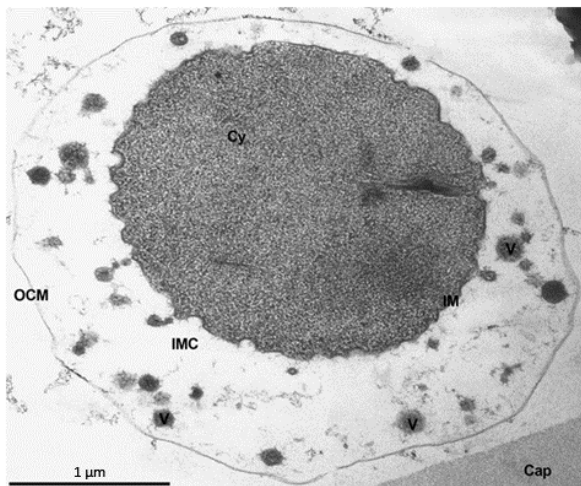
*I. hospitalis* wächst obligat anaerob und chemolithoautotroph. Seine einzige Energie liefernde Reaktion ist die Reduktion von elementarem Schwefel mit molekularem Wasserstoff zu Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ) (Paper et al., 2007). Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) stellt eine Kohlenstoffquelle dar und wird über einen bislang nur bei *I. hospitalis* bekannten  $CO_2$ -Fixierungsweg, den sog. Dicarboxylat/4-Hydroxybutyratzyklus, assimiliert (Jahn et al., 2007; Huber et al., 2008). Kürzlich wurde im Phylum der *Thaumarchaeota* ein ähnlicher  $CO_2$ -Fixierungsweg beschrieben, wobei davon ausgegangen wird, dass sich die beiden Wege unabhängig voneinander entwickelt haben (Könneke et al., 2014). Des Weiteren werden von *I. hospitalis* unter anderem auch Acetat und Pyruvat aufgenommen, wobei der weitere Metabolismus noch unklar ist (Jahn et al., 2007).

Die limitierte Stoffwechselvariabilität von *I. hospitalis* lässt sich durch das stark reduzierte Genom erklären. *I. hospitalis* besitzt ein einziges zirkuläres Chromosom von ca. 1,3 Mbp Länge. Damit ist es eines der kleinsten bekannten Genome von frei lebenden Organismen. Lediglich etwa 1400 für Proteine kodierende Gene wurden aufgrund der Annotation vorhergesagt und in Proteomanalysen zu einem sehr hohen Prozentsatz (> 80 %) verifiziert (Giannone et al., 2011; Giannone et al., 2014). Darunter befinden sich eine vollständige  $A_1A_0$



ATP-Synthase/ATPase, zwei Typen von Schwefelreduktasen, eine Hydrogenase sowie einige wenige Transporter und die Komponenten des Sec- und des Tat-Systems für den Proteintransport innerhalb der Zelle (Podar et al., 2008).

Der Proteintransport muss in *I. hospitalis* ein gut koordinierter Vorgang sein, da sichergestellt sein muss, dass ein Protein an seinen Zielort in der inneren bzw. äußeren Zellmembran bzw. in dem entsprechenden Kompartiment gelangt. Wie bereits erwähnt, besitzt *I. hospitalis* zwei Membranen (Abb. 1.2), von denen die innere das Cytoplasma umgibt, in welchem DNA und Ribosomen lokalisiert sind (Küper et al., 2010). Sie besteht aus Di- und Tetraetherlipiden (Archaeol und Caldarchaeol; Jahn et al., 2004) und obwohl davon ausgegangen werden muss, dass sie Transporter für verschiedene Metaboliten beherbergt (Giannone et al., 2011), konnten bislang keine entsprechenden Proteine identifiziert oder lokalisiert werden. Dies ist jedoch Teil der aktuellen Forschung (laufende Doktorarbeiten von



**Abb. 1.2** Ultradünnschnitt einer *I. hospitalis*-Zelle. Cy: Cytoplasma, IM: innere Membran, IMC: Intermembrankompartiment, OCM: äußere Zellmembran, Cap: Cellulosekapillare (aus Huber et al., 2012)

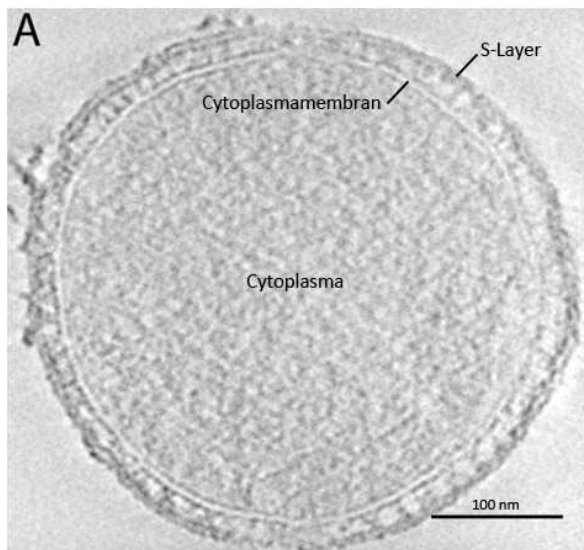
Stefanie Daxer und Pia Wiegmann). Es gibt Hinweise auf eine membrangebundene Pyrophosphatase, die möglicherweise die innere Membran für Transportprozesse energetisiert. Allerdings sind noch keine Antikörper gegen dieses Protein verfügbar, so dass bislang keine Lokalisierungsstudien vorgenommen werden konnten (Daxer, 2011). Zwischen der inneren und der äußeren Zellmembran befindet sich das sog. Intermembrankompartiment (IMC) (Huber et al., 2012; Abb. 1.2). Anfangs wurde angenommen, dass das IMC ein dem Periplasma von Gram-negativen Bakterien ähnliches ‚Kompartiment‘ darstellt, das zahlreiche Vesikel enthält (Rachel et al., 2002). In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass dort verschiedene metabolische Prozesse stattfinden (Küper et al., 2010; Mayer et al., 2012a) und dass die Vesikel meist nicht frei vorkommen, sondern Teil eines endogenen Membransystems aus Röhren sind. Darüber hinaus gibt es Filamentstrukturen im IMC, die möglicherweise eine Art Cytoskelett bilden (Heimerl, 2014). Nach außen hin ist das IMC von der sog. äußeren Zellmembran (outer cellular membrane – OCM; Abb. 1.2) abgegrenzt, deren Name bereits auf die funktionellen und strukturellen Unterschiede zur äußeren Membran von gramnegativen Bakterien hinweist (Huber et al., 2012). Sie besteht im Gegensatz zur inneren Membran nur aus Dietherlipiden (Archaeol; Jahn et al., 2004) sowie dem Protein Ihomp1 in sehr großer Anzahl (früher Imp1227; Burghardt et al., 2007; Rachel et al., 2002). Ihomp1 hat eine Masse von 6,23 kDa und bildet in der OCM homodekamere, porenähnliche Komplexe. Diese haben einen Durchmesser von 7 nm und

weisen nach Negativkontrastierung eine mit dem Kontrastmittel gefüllte ‚Pore‘ von 2 nm auf. Ob die ‚Pore‘ *in vivo* existiert und offen ist, ist genauso wenig geklärt wie die Funktion dieses über die gesamte äußere Zellmembran verteilten Proteinnetzes. Da Ihomp1 jedoch nur bei *I. hospitalis* und nicht bei anderen Vertretern der Gattung *Ignicoccus* zu finden ist, wird vermutet, dass es eine zentrale Rolle bei der Interaktion mit *N. equitans* spielt (Burghardt et al., 2007; Huber et al., 2012). Dass Ihomp1 tatsächlich eine offene Pore ausbildet, die einen Ionenfluss durch die Membran möglich macht, ist nahezu ausgeschlossen, da die äußere Zellmembran von *I. hospitalis* energetisiert ist und ein Ionengradient aufrechterhalten werden muss. Durch Immunmarkierungsversuche an Ultradünnschnitten und an ganzen Zellen konnte gezeigt werden, dass die OCM sowohl die ATP-Synthase/ATPase (die sekundäre Ionenpumpe) als auch die Schwefelreduktase (die primäre Ionenpumpe) sowie die Acetyl-CoA-Synthetase (ACS – ein ATP-verbrauchendes Enzym) beherbergt (Küper et al., 2010; Mayer et al., 2012a). Es gibt also eine räumliche Trennung von DNA-Replikation sowie Proteinbiosynthese im Cytoplasma und Energiegewinnung im IMC (Küper et al., 2010; Huber et al., 2012). Die Lokalisation weiterer ATP-verbrauchender Stoffwechselreaktionen neben der ACS wie beispielsweise von Schritten des CO<sub>2</sub>-Fixierungsweges ist Gegenstand aktueller Forschung (laufende Doktorarbeit von Jennifer Flechsler).

Die anderen bekannten Vertreter der Gattung *Ignicoccus* (*I. islandicus*, *I. pacificus* und das Isolat MEX13A) weisen bezüglich Physiologie und Zellstruktur große Ähnlichkeiten zu *I. hospitalis* auf. Sie haben alle eine Zellhülle aus zwei Zellmembranen und wachsen chemolithoautotroph auf elementarem Schwefel (Huber et al., 2000; Lange, 2009). Bei dem Isolat MEX13A konnte die Dynamik der vesikulären/tubulären Strukturen im IMC anschaulich dargestellt werden (Lange, 2009; Heimerl, 2014). Ansonsten ist über diesen Stamm noch recht wenig bekannt, was unter anderem daran liegt, dass es bisher nicht möglich war, ihn im Großmaßstab zu züchten (Information von Dr. H. Huber und C. Wartner) und somit nicht genügend Zellmaterial für biochemische Untersuchungen zu Verfügung steht. Bei *I. islandicus* und *I. pacificus* wurde von Zellanhängen berichtet (Huber et al., 2000), die bei *I. pacificus* näher charakterisiert und zum einen als ‚IPEPs‘ (*I. pacificus* extracellular particles) und zum anderen als ‚Flagellen‘ bezeichnet wurden (Meyer, 2007). Letztere konnten über ihre N-terminale Sequenz als Homologe zu den Fiberproteinen von *I. hospitalis* identifiziert werden (Meyer, 2010). Immunmarkierungsversuche mit ganzen Zellen der drei bekannten *Ignicoccus*-Arten zur Lokalisation der an der Energiegewinnung beteiligten Enzymkomplexe zeigten, wie bei *I. hospitalis*, Signale an der äußeren Zellmembran (Daxer, 2011). Markierungen an Ultradünnschnitten waren diesbezüglich jedoch nicht eindeutig. Während bei *I. pacificus* und MEX13A keine spezifische Markierung erreicht werden konnte, wurde bei *I. islandicus* eine schwache aber eindeutige, gleichmäßige Markierung der äußeren Zellmembran sowie des Cytoplasmas detektiert (Flechsler, 2010).

Ein Grund, weshalb bislang der Fokus der Forschung vornehmlich auf *I. hospitalis* lag und über seine nächsten Verwandten noch verhältnismäßig wenig bekannt ist, liegt wohl darin, dass *I. hospitalis* der einzige bekannte Wirt für *Nanoarchaeum equitans* ist (Huber et al., 2002). Diese Assoziation zweier Archaeen galt lange Zeit als einmalig, jedoch wurden mittlerweile weitere Vertreter der *Nanoarchaeota* in verschiedenen Ökosystemen entdeckt und beschrieben (Hohn et al., 2002; Podar et al., 2013) und vor kurzem auch kultiviert (Mitteilung von Dr. Mircea Podar).

*N. equitans*-Zellen sind kleine Kokken mit einem Durchmesser von 350 bis 500 nm (Huber et al., 2002). Sie zeigen bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen ein dicht gepacktes Cytoplasma, das von einer Membran umgeben ist (Junglas et al., 2008; Abb. 1.3). Diese weist



**Abb. 1.3** Schicht aus Tomogramm einer *N. equitans*-Zelle (aus Heimerl, 2014)

eine nahezu identische Zusammensetzung wie die innere Membran von *I. hospitalis* auf (Jahn et al., 2004). Nach einem etwa 20 nm breiten periplasmatischen Spalt folgt ein S-Layer – eine gleichmäßige Proteinschicht aus Glycoprotein (Junglas et al., 2008; Abb. 1.3). Die optimalen Wachstumsbedingungen von *N. equitans* sind denen von *I. hospitalis* sehr ähnlich (Jahn et al., 2008; Paper et al., 2007). Hier zeigte *N. equitans* eine minimale Verdopplungszeit von 45 Minuten (Jahn et al., 2008). Für das Wachstum von *N. equitans* ist ein direkter Zellkontakt mit *I. hospitalis* notwendig (Huber et al., 2002).

Die Kontaktstelle zwischen den beiden Zellen ist sehr klein (40 – 170 nm im Durchmesser), was eine detaillierte Untersuchung schwierig macht (Junglas et al., 2008). Es wurde jedoch gezeigt, dass *N. equitans*-Zellen oftmals am ‚Cytoplasma-Pol‘ einer *I. hospitalis*-Zelle anheften, wo die innere und die äußere Zellmembran direkt übereinander liegen (Junglas et al., 2008; Heimerl, 2014). Neueste elektronentomographische Analysen lassen hier einen direkten Kontakt der Cytoplasmen erkennen, wobei der S-Layer von *N. equitans* an dieser Stelle degeneriert zu sein scheint. Filamentöse Strukturen scheinen die Verbindung zu stabilisieren (Heimerl, 2014). Eine solche Verbindung würde den Metabolit-Transport von *I. hospitalis* zu *N. equitans* erleichtern, der für Lipide, Aminosäuren und einige Proteine bereits nachgewiesen wurde (Jahn et al., 2004; Jahn et al., 2008; Giannone et al., 2011; Heimerl, 2014). Im Genom von *N. equitans* fehlen viele Gene für verschiedene Stoffwechsel- und Biosynthesewege, was den Import weiterer Stoffwechselprodukte von *I. hospitalis* wahrscheinlich macht (Waters et al., 2003). Das Genom besteht aus nur 0,49 Mbp in einem zirkulären Chromosom und ist somit eines der kleinsten bislang bekannten Genome. Nichtsdestotrotz enthält es alle notwendigen Gene für Replikation, Transkription,

Translation, DNA-Reparatur und Zellzyklus (Waters et al., 2003). Das S-Layer-Protein NEQ300 sowie das S-Layer-assoziierte Protein NEQ236 wurden in Proteomanalysen als äußerst abundant eingestuft. Hier konnten auch die Untereinheiten A, B, D und a der  $A_1A_0$  ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* nachgewiesen werden. Vermutlich aufgrund seiner starken Hydrophobizität war die Untereinheit c in diesen Proteomanalysen nicht vertreten (Giannone et al., 2011). Ob die fünf im Genom von *N. equitans* annotierten Untereinheiten einer ATP-Synthase/ATPase für ein stabiles, funktionsfähiges Enzym kodieren und ob dieses Enzym ATP synthetisieren oder lediglich hydrolysieren kann, konnte bis heute nicht geklärt werden (Waters et al., 2003; Küper, 2010).

Neben der Reinigung und Charakterisierung der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* und somit der Beantwortung der Frage, ob *N. equitans* selbst ATP synthetisieren kann, sollte in dieser Arbeit auch die ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* weitergehend untersucht werden. Bislang wurden neben den Lokalisierungsstudien (Küper et al., 2010) auch Versuche zur Reinigung des Enzyms durchgeführt, die jedoch nicht in einem isolierten Gesamtkomplex resultierten (Röhl, 2010; Küper, 2010; Kreuter, 2010). Der  $A_1$ -Subkomplex konnte zwar gereinigt und dessen Stöchiometrie zu  $A_3B_3EF$  bestimmt werden, jedoch blieben Kristallisationsexperimente erfolglos und auch mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte die Struktur, die mit nur einem peripheren Stiel für eine archaeele ATP-Synthase/ATPase sehr ungewöhnlich wäre, nicht verifiziert werden (Küper, 2010). In dieser Arbeit sollten bestehende Reinigungsprotokolle optimiert und ggf. neue Protokolle entwickelt werden, so dass eine Reinigung des Gesamtkomplexes der ATP-Synthase/ATPase gelingt. Die erarbeiteten Methoden sollten auch auf die Reinigung der entsprechenden Enzymkomplexe aus *I. pacificus* und *I. islandicus* angewendet werden, um vorhandene Unterschiede und Gemeinsamkeiten der ATP-Synthasen/ATPasen dieser nah verwandten Arten zu erkennen und zu beschreiben.

Da in der Vergangenheit Versuche zur Reinigung der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* aufgrund der geringen Massen von angereicherten *N. equitans*-Zellen nahezu unmöglich waren, sollten diese mit Zellen der Kokultur von *I. hospitalis* und *N. equitans* durchgeführt werden. Die bereits gesammelten Erkenntnisse über die ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* sollten es möglich machen, die beiden Enzyme während der Reinigung zu differenzieren.

Zudem sollten die jeweiligen c-Untereinheiten der ATP-Synthasen/ATPasen von *I. hospitalis* und *N. equitans*, die bislang in Proteomstudien nicht repräsentiert waren, isoliert und charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Substanzen und Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Lösungsmittel

Substanz	Hersteller
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Acetonitril	J. T. Baker, Deventer, NL
Acrylamid 2x, research grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Acrylamid 4x, analytical grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Acrylamid 30 % (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Adenosin-5'-Triphosphat, Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Adenosin-5'-Triphosphat, Dinatriumsalz, ultrapur	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Adenosin-5'-Triphosphat, Magnesiumsalz 95 %	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Albumin Fraction V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bacto Hefeextrakt	BD, Heidelberg
Benzylviologen	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Bis(tributyltin)oxid (TBT-Oxid)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
BisTris	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Diethylstilbestrol (DES)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
$\epsilon$ -Aminocapronsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol absolut	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Glutaraldehyde solution, Grade I, 25 %	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Glycerin, 86 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Imidazol, ACS Reagenz 99 %	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Isopropanol	J. T. Baker, Deventer, NL
Methylenblau	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriummetabisulfit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), ACS Reagenz 97+ %	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Natriumthiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	Riedel-de Haen, Seelze

N-(1,1-Dimethyl-2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropansulfonsäure (AMPSO)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltopyranosid (DDM)	Anatrace Inc., Maumee, OH, USA
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
N,N'-Methylenbisacrylamid 2x	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (OG)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Polyethylenglykol (PEG) 6000	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ponceau S	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Resazurin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Schwefel	Riedel-de Haen, Seelze
Serva Blue G	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Silbernitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tricin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)aminoethan	USB Corporation, Cleveland, OH, USA
Triton X-100	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Trypsin,sequencing grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tween 20	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen

Alle übrigen, hier nicht aufgeführten Chemikalien und Biochemikalien wurden von der Firma VWR (Darmstadt) bezogen. Die Qualität betrug, falls nicht anders angegeben, p.a. (zur Analyse).

### 2.1.2 Gase

Alle verwendeten Gase wurden von der Firma Linde Technische Gase GmbH in Höllriegelskreuth bezogen.

### 2.1.3 Molekularmassenstandards

Molekularmassenstandard	Hersteller
High Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis	GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.4 Reaktionskits, Membranen und Filtereinheiten

Artikel	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL (USA)
Faltenfilter, Ø 270 mm bzw. 320 mm	Schleicher & Schuell, Dassel
Immobilon-P™ Transfermembran	Millipore, Bedford, MA (USA)
Lumi-Light™ Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Spritzenaufsatzfilter (Celluloseacetat), 0,2 µm/ 0,45 µm	VWR, Darmstadt
Vivaspin™ (Polyethersulfan), MWCO 100 000	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Whatman Membranfilter (Cellulosemischester), 0,2 µm	GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
Whatman Chromatography Paper (3MM Chr)	GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK

### 2.1.5 Indikatoren für physiologische und zellbiologische Untersuchungen

Indikator	Hersteller
Blei(II)-Acetatpapier	Machery-Nagel, Düren
pH-Indikatorpapier	VWR, Darmstadt
DAPI	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
SYTO®9 nucleic acid stain	Invitrogen, Eugene, USA
Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit	Invitrogen, Eugene, USA

### 2.1.6 Antikörper

Primärantikörper	Ursprung des Antigens	Hersteller
rabbit anti-atp A <sub>1</sub>	<i>Ignicoccus pacificus</i>	Davids Biotechnologie, Regensburg
rabbit anti-atp A <sub>1</sub>	<i>Ignicoccus hospitalis</i>	Davids Biotechnologie, Regensburg
rabbit anti-atp a (rec)	<i>Ignicoccus hospitalis</i>	Davids Biotechnologie, Regensburg
rabbit anti-atp c (syn)	<i>Ignicoccus hospitalis</i>	GenScript, Piscataway, USA
rabbit anti-atp B	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Davids Biotechnologie, Regensburg
rabbit anti-atp C	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Davids Biotechnologie, Regensburg
rabbit anti-atp D	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Davids Biotechnologie, Regensburg
rabbit anti-atp E	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Davids Biotechnologie, Regensburg
rabbit anti-atp F	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Davids Biotechnologie, Regensburg
rabbit anti-SRed	<i>Pyrodictium abyssi</i> TAG 11	Uni Regensburg (Dirmeier, 1998)
anti-Thermosom	<i>Ignicoccus hospitalis</i>	Davids Biotechnologie, Regensburg
anti-S-Layer	<i>Nanoarchaeum equitans</i>	Davids Biotechnologie, Regensburg

Die Antikörper gegen den A<sub>1</sub>-Subkomplex von *I. hospitalis* sowie gegen die ATP-Synthase-Untereinheiten a und c entstanden im Rahmen der Promotion von Ulf Küper (Küper, 2010) am Lehrstuhl für Mikrobiologie. Der Antikörper gegen die H<sub>2</sub>:Schwefel-Oxidoreduktase (SRed) von *P. abyssi* TAG 11 wurde von Reinhard Dirmeier während seiner Promotion am Lehrstuhl für Mikrobiologie generiert (Dirmeier, 1998). Der Antikörper gegen den S-Layer von *N. equitans* entstand im Rahmen der Diplomarbeit von Thomas Menzel am Lehrstuhl für Mikrobiologie (Menzel, 2007) und der Antikörper gegen das Thermosom von *I. hospitalis* während der Diplomarbeit von Florian Mayer (Mayer, 2008). Die Antikörper gegen die Untereinheiten der ATP-Synthase von *M. jannaschii* wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Volker Müller von der Goethe Universität in Frankfurt/Main zur Verfügung gestellt.

Für die Gewinnung des Antikörpers gegen den A<sub>1</sub>-Subkomplex der ATP-Synthase von *I. pacificus* wurde der Komplex gereinigt, in einer nativen Gelelektrophorese aufgetrennt und der Firma Davids Biotechnologie in Regensburg übergeben, wo der Proteinkomplex aus dem Gel extrahiert und einem Kaninchen injiziert wurde.

Sekundärantikörper	Hersteller
goat anti-rabbit IgG + DyLight 650	Thermo, Rockford, USA
goat anti-rabbit IgG + HRP	Sigma, St. Louis, USA

## 2.2 Sterilisation

Glaswaren (Schott Glaswerke, Mainz), Spatel und Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht) und Spritzen (Ersta, Maersk, DK und BD, Drogheda, IE) wurden 40 Minuten bei 121°C und 200 kPa Druck bei feuchter Hitze sterilisiert (Autoklav von Wolf SANOclav, Geislingen). Anschließend wurden die Materialien im Trockenschrank (Heraeus, Hanau) bei 60°C getrocknet.

Glaspipetten wurden über Nacht bei 140°C und trockener Hitze sterilisiert.

Puffer, insbesondere Chromatographiepuffer und andere Waschlösungen für Chromatographiesäulen, wurden über Whatman Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert.



## 2.3 Mikroskopie

### 2.3.1 Lichtmikroskopie

Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurde mit einem Olympus BX 60 Phasenkontrastmikroskop (Olympus, Hamburg) gearbeitet. Standardmäßig wurde ein Okular mit 10facher Vergrößerung in Kombination mit einem Ölimmersionsobjektiv (100x / 1.30 Oil Ph3) eingesetzt. Zur Dokumentation wurden eine EOS D 60 Spiegelreflexkamera (Canon, Tokyo, Japan) und die EOS Utility Steuerungssoftware verwendet.

Die Aufnahmen wurden mit dem Programm Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., San José, USA) bearbeitet.

Für die Zellzahlbestimmung wurde eine Thoma-Zählkammer (Marienfeld, Lauda-Königshofen) eingesetzt. Unter Verwendung eines Luftobjektivs (40x / 0.75 Ph2) wurden die Zellen entsprechend den Herstellerangaben gezählt und die Zellzahl berechnet. Eine Zelle pro Kleinstquadrat entsprach  $2 \times 10^7$  Zellen/ml.

### 2.3.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Durchführung von elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgte durch Frau Jennifer Flechsler und Prof. Dr. Reinhard Rachel an einem Philips CM12 Transmissionselektronenmikroskop (FEI, Eindhoven, NL) mit LaB<sub>6</sub>-Kathode und einer digitalen Slow-Scan-CCD-Kamera (TEM-1000; TVIPS, Gauting) sowie an einem JEOL JM-2100F (JEOL Ltd., Tokyo, JP) mit Feldemissionskathode und 4k x 4k CMOS Kamera (TemCam-F416; TVIPS, Gauting).

Die Aufnahmen wurden mit dem Programm Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., San José, USA) bearbeitet.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen von Proteinlösungen wurden negativ kontrastierte Suspensionspräparate hergestellt. Ein mit Kohlefilm belegtes Kupfernetzchen (G 2200C: 200 Square Mesh, Plano, Wetzlar) wurde in einem Plasma Cleaner (Plasma Cleaner PDC-XG, Harrick Plasma, Ithaca, USA) hydrophilisiert. Anschließend wurde es mit dem Kohlefilm nach unten für 10 bis 30 Sekunden auf einen Tropfen der Proteinlösung (20 – 50 µg/ml) gelegt. Die Lösung wurde mit einem Filterpapier abgezogen und das Präparat einmal mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Negativkontrastierung für etwa 30 Sekunden. Die Kontrastierlösung wurde abgezogen und das Kupfernetzchen luftgetrocknet. Als Kontrastierlösung diente Uranylacetatlösung (2 %,

w/v), Phosphorwolframsäure (2,5 %, w/v) oder Ammoniummolybdat (2 %, w/v). Die Analyse erfolgte im TEM unter Low-Dose-Bedingungen.

Parallel wurden sowohl Proteinlösungen als auch präparierte Kupfernetzchen an Dr. Janet Vonck vom Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt/Main übergeben, die ebenfalls elektronenmikroskopische Analysen durchführte.

## 2.4 Verwendete Organismen und Kultivierung

### 2.4.1 Verwendete Stämme

Organismus	Stamm	Herkunft	Hinterlegung	Literatur
<i>Ignicoccus hospitalis</i>	Kin4/I	Kolbeinsey Rücken	DSM 18386	Paper et al., 2007
<i>Ignicoccus hospitalis</i> + <i>Nanoarchaeum equitans</i>	Kin4/M	Kolbeinsey Rücken	BBR 17/10/4	Huber et al., 2002
<i>Ignicoccus islandicus</i>	Kol8	Kolbeinsey Rücken	DSM 13165	Huber et al., 2000
<i>Ignicoccus pacificus</i>	LPC33	Ostpazifischer Rücken	DSM 13166	Huber et al., 2000

### 2.4.2 ½ SME *Ignicoccus* Medium

#### 2.4.2.1 Zusammensetzung (Huber et al., 2000; Paper et al., 2007)

½ SME Medium		Synthetisches Meerwasser	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g	NaCl	27,70 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	7,00 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,16 g	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	5,50 g
Synthetisches Meerwasser	500 ml	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,75 g
Resazurin (0,1 %)	1,0 ml	KCl	0,65 g
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	ad 1000 ml	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,03 g
S <sup>0</sup>	10 g	NaBr	0,10 g
Na <sub>2</sub> S	0,5 g	SrCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	15 mg
		KJ-Lösung (1 mg/ml)	50 µl
		H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	ad 1000 ml

#### 2.4.2.2 Herstellung in Serumflaschen

Synthetisches Meerwasser wurde separat hergestellt und bei 4°C gelagert. Für die Herstellung des Mediums stand es als Stammlösung zur Verfügung. Die übrigen

Medienbestandteile bis auf Schwefel und Natriumsulfid wurden darin gelöst und anschließend mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  auf 1 l aufgefüllt. Die entsprechende Menge Schwefel wurde dem Medium in einer Duranglasflasche (Schott, Mainz) zugegeben und dieser mit Hilfe eines Ultraturrax T 25 basic (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) fein zerkleinert. Anschließend wurde das Medium mit  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (80/20, v/v) unter Druckausgleich durchgast und so Sauerstoff weitgehend ausgetrieben. Durch Zugabe von Natriumsulfid wurde der verbliebene Sauerstoff chemisch reduziert. Danach wurde der pH-Wert überprüft und ggf. mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf pH 5,5 – 6,0 eingestellt. Das Abfüllen in 120 ml Serumflaschen (Natronkalksilikatglas, Stute GmbH, Rheinbreitbach) bzw. 1 l Druckflaschen (Borsilikatglas, Müller und Krempel AG, Büllach, CH) erfolgte in einer Anaerobenkammer (COY Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA). Die mit je 20 ml Medium befüllten Serumflaschen wurden mit Butylsepten (Ochs, Bovenden) verschlossen und diese mit Aluminiumbördelkappen (WICOM, Heppenheim) gesichert. Die mit je 250 ml Medium befüllten Druckflaschen wurden mit Gummistopfen und Metallschraubkappen verschlossen. An einer Gasstation wurden die Serum- bzw. Druckflaschen dreimal evakuiert und ein Gasgemisch von  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80/20, v/v) aufgepresst, wobei für Serumflaschen ein Überdruck von 200 kPa (2 bar) und für Druckflaschen von 80 kPa (0,8 bar) eingestellt wurde. Die Flaschen mit Medium wurden bei 110°C, 200 kPa und feuchter Hitze für 60 Minuten sterilisiert (Autoklav von Wolf SANOclav, Geislingen) und konnten danach bei Raumtemperatur gelagert werden.

#### **2.4.2.3 Herstellung für Großanzuchten im Fermenter**

Alle Medienbestandteile bis auf Resazurin, Schwefel und Natriumsulfid wurden in entsprechender Menge abgewogen und in einem Fermenter mit 300 l Gesamtvolumen (Typ HTE, Pfaudler-Werke AG, Schwetzingen) in 250 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  gelöst. Anschließend wurde das Medium 1 Stunde bei 121°C autoklaviert und gleichzeitig durch Durchgasung mit  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (80/20, v/v) der Sauerstoff weitgehend ausgetrieben.

Natriumsulfid wurde separat abgewogen, in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  gelöst und für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Ebenso wurde mit Hefeextrakt verfahren, der für mixotrophe Kultivierungsbedingungen in einer Endkonzentration von 0,1 % zugegeben wurde. Der Schwefel wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  versetzt und mit Hilfe eines Ultraturrax (TP 1842, Janke & Kunkel, Staufen) homogenisiert. Anschließend wurde er für 1 Stunde bei 110°C sterilisiert. Schwefel, Natriumsulfid und ggf. Hefeextrakt wurden direkt vor dem Animpfen zugegeben. Nach Zugabe aller Medienzusätze wurde der pH-Wert mit ca. 50 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1:2) auf pH 5,5 – 6,0 eingestellt.

## 2.4.3 Kultivierung

### 2.4.3.1 Kultivierung in Serumflaschen

Die Kultivierung in Serum- bzw. Druckflaschen erfolgte strikt autotroph. Serumflaschen wurden mit je 0,2 ml, Druckflaschen mit je 2 ml gut bewachsener Vorkultur angeimpft, was einer Animpfdichte von ca.  $10^5$  Zellen/ml entsprach. Die Inkubation erfolgte bei 90°C in Wärmeschränken (Heraeus, Hanau bzw. Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) mit Schütteleinsatz (Mechanikwerkstatt Biologie, Universität Regensburg). Das Wachstum wurde lichtmikroskopisch überprüft.

### 2.4.3.2 Kultivierung im Fermenter

Der Fermenter (Typ HTE, Pfaudler-Werke AG, Schwetzingen) mit 250 l Medium wurde mit 3 l Vorkultur aus Druckflaschen angeimpft, was zu einer Anfangszellzahl von  $4,5 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Zellen/ml führte. Bei strikt autotrophen Kultivierungen wurde mit ca. 2 g gefrorenen, ebenfalls autotroph gezüchteten Zellen angeimpft. Die Kultivierung erfolgte anaerob mit einer Gasphase von  $H_2/CO_2$  (80/20, v/v) und einem Druck von 300 kPa bei 90°C unter Rührung (100 UpM). Ab einer Zelldichte von ca.  $3 - 6 \times 10^6$  Zellen/ml wurde mit einem Gemisch aus  $N_2/H_2/CO_2$  (65/15/20, v/v/v) mit einer Flussrate von 60 l/min durchgast. Das Wachstum wurde etwa alle 1,5 Stunden durch Auszählen mit einer Thoma-Zählkammer kontrolliert.

### 2.4.3.3 Zellernte nach Kultivierung im Fermenter

Für die Zellernte von *Ignicoccus*-Reinkulturen aus dem Fermenter wurde die Zellsuspension zunächst über einen Gegenstromkühler (Feichtenschlager Edelstahl-Industrieanlagen, Neusäss) auf 4°C abgekühlt, damit der Zellstatus zum Zeitpunkt der Ernte weitestgehend erhalten blieb. Die Kultur wurde in einem sterilisierten Tank (Gresser, Regensburg) zwischengelagert, in dem nicht verbrauchter Schwefel sedimentierte und anschließend abgelassen werden konnte. Die Zellen wurden über eine Durchlaufzentrifuge (Typ Z416, Padberg, Lahr) bei einer Flussgeschwindigkeit von ca. 15 l/min geerntet. Das Zellsediment wurde in dem im Rotor verbliebenen Medium suspendiert und nochmals in einer Jouan-Zentrifuge (Jouan KR 422, Rotor C-60) bei 4300 UpM und 4°C für 45 Minuten sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen sofort verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Bei der Ernte der Co-Kultur von *I. hospitalis* und *N. equitans* wurde zunächst wie oben beschrieben vorgegangen. Um freie *N. equitans*-Zellen mittels differentieller Zentrifugation von *I. hospitalis*-Zellen mit noch anhaften *N. equitans*-Zellen abtrennen zu können, wurde das Zellsediment aus der Durchlaufzentrifuge sehr sorgfältig im Medium suspendiert. Anschließend wurde für 45 Minuten bei 4300 UpM und 4°C in einer Jouan-Zentrifuge (Jouan KR 422, Rotor C-60) zentrifugiert. Das Zellpellet, bestehend aus *I. hospitalis*-Zellen mit anhaftenden *N. equitans*-Zellen, wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die im Überstand enthaltenen freien *N. equitans*-Zellen wurden für 1 Stunde bei 13000 UpM und 4°C sedimentiert (Sorvall RC 5C Plus, Rotor GSA). Das Zellpellet wurde in 10 ml schwefelfreiem ½ SME *Ignicoccus* Medium aufgenommen und die Suspension nochmals für 30 Minuten bei 13000 UpM und 4°C zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, Rotor SS34). Die auf diese Weise aufkonzentrierten *N. equitans*-Zellen konnten sofort verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden.

## 2.5 Zellaufschluss

### 2.5.1 Puffer

Tris Lysepuffer, pH 8,0 (eingestellt mit HCl)			„FfM“ Lysepuffer, pH 8,0 (eingestellt mit HCl)		
Tris	25 mM		Tris	25 mM	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM		MgCl <sub>2</sub>	5 mM	
PMSF	0,1 mM	oder	PMSF	0,1 mM	oder
AMPSO Lysepuffer, pH 9,0 (eingestellt mit NaOH)			HEPES Lysepuffer, pH 7,0 (eingestellt mit NaOH)		
AMPSO	25 mM		HEPES	50 mM	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM		MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
PMSF	0,1 mM	oder	PMSF	0,1 mM	

Es wurden ca. 0,1 – 0,5 g Zellen/ml im jeweiligen Puffer gelöst und die Suspension mit DNase I versetzt.

### 2.5.2 French Press

Eine French Press Zelle (French Pressure Cell Press von American Instrument Company, Silver Spring, MD, USA) wurde zunächst einmal mit 70 %igem Ethanol und zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub>,

welches mit 0,1 mM PMSF versetzt war, gespült. Anschließend wurde mit dem jeweiligen Lysepuffer equilibriert.

Eine Zellsuspension wurde durch dreimalige Passage bei einem Druck von 500 – 600 PSI (3,5 – 4,1 MPa) und der Einstellung ‚high‘ aufgeschlossen. Die Aufschlusseffizienz wurde lichtmikroskopisch kontrolliert.

## **2.6 Membranpräparation**

### **2.6.1 Differentielle Zentrifugation**

Nach dem Zellaufschluss wurde das Lysat einer differentiellen Zentrifugation unterzogen, um grobe Zellbestandteile und nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen. Diese erfolgte in einer Beckmann Avanti J-25 mit dem Rotor JLA 16.250 (Beckmann Coulter, Palo Alto, CA, USA) bei 4°C und 8500 bzw. 11000 g für jeweils 15 Minuten. Anschließend wurden mittels Ultrazentrifugation (Beckmann Optima LE-80K, Rotor 70Ti von Beckmann Coulter, Palo Alto, CA, USA) bei 4°C und 45000 UpM (150000 g) für 2 Stunden die Membranen sedimentiert.

### **2.6.2 Dichtegradienten-Zentrifugation**

Bei der Dichtegradientenzentrifugation bilden Teilchen der gleichen Größe, Form und Dichte separate Zonen in einem Gradienten (Pertoft, 2000), was eine Auftrennung der Probe nach diesen Parametern ermöglicht. In dieser Arbeit wurden Saccharosegradienten von 20 – 70 % (w/v) sowie von 50 – 80 % (w/v) und 10 – 30 % (w/v) eingesetzt.

#### **2.6.2.1 Herstellung der Auftragssuspension**

Vorbereitend für die Auftrennung im Saccharosegradienten wurde das Lysat einem Zentrifugationsschritt unterzogen, bei dem lösliche Proteine („Cytoplasma“) abgetrennt wurden. Dieser erfolgte in einer Beckmann Avanti J-25 mit dem Rotor JA 25.50 (Beckmann Coulter, Palo Alto, CA, USA) bei 4°C und 60000 g für 1 Stunde. Die sedimentierten Membranen und Zelltrümmer („Pellet“) wurden mit ca. 5 ml Lysepuffer in einen Gewebehomogenisator (Wheaton, Millville, NJ, USA) überführt und auf Eis einige Minuten sanft („loose“-Stößel) suspendiert.

### 2.6.2.2 Saccharosegradient

Die linearen Saccharosegradienten wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers (Eigenbau der Mechanikwerkstatt Biologie, Universität Regensburg) hergestellt. Hierfür wurden pro Gradient 4,6 ml der niedriger konzentrierten Saccharoselösung (in Lysepuffer) in die linke Kammer des Gradientenmischers und 4,6 ml der höher konzentrierten Saccharoselösung (in Lysepuffer) in die rechte Kammer des Gradientenmischers pipettiert. Anschließend wurde unter ständigem Rühren der beiden Lösungen (Magnetrührer MR3001 von Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim) der Saccharosegradient direkt in einem Zentrifugenröhrchen (Beckmann UltraClear, 14 x 89 mm von Beckmann Coulter, Palo Alto, CA, USA) von unten nach oben aufgebaut.

Von der Auftragssuspension wurden etwa 1,5 ml pro Gradient aufgetragen, woraufhin in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Optima LE-80K, Rotor SW41, Beckmann Coulter, Palo Alto, CA, USA) für 3,5 – 4 Stunden bei 40500 UpM (210000 g) und 4°C zentrifugiert wurde. Bei Gradienten von 50 – 80 % (w/v) wurde die Temperatur auf 10°C erhöht, um ein Kristallisieren der Saccharose zu verhindern. Das Ergebnis wurde mit einer Digitalkamera (EOS D 60 Spiegelreflexkamera, Canon, Tokyo, Japan) dokumentiert, die Banden mit einer sterilen 3 ml Spritze (Henke Sass Wolf, Tuttlingen) entnommen und der Rest verworfen. Die erhaltenen Fraktionen wurden mikroskopiert und mit dem ‚Longtest‘ (Kap. 2.13.1.2) die ATP-Hydrolyseaktivität bestimmt.

## 2.7 Solubilisierung

Die Solubilisierung von Membranproteinen erfolgte mit dem Detergenz DDM in einer Konzentration von 1 mg DDM/mg Protein. Das Protein-Seife-Verhältnis (PSV) betrug somit 1. Die Suspension mit einer Endkonzentration von etwa 0,5 % DDM wurde in Aliquots von je 1 ml für 2 Stunden bei Raumtemperatur sanft (25 UpM) geschüttelt (Überkopfschüttler RM-2L, ELMI, Riga, Lettland).

Nach erfolgter Solubilisierung wurden mittels Ultrazentrifugation die Membranen („MnS“) sedimentiert und so von den nun gelösten Proteinen („Solubilisat“) abgetrennt. Dies erfolgte in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Optima LE-80K) mit dem Rotor 70.1Ti für 1,5 Stunden bei 40000 UpM (110000 g) und 4°C.

## 2.8 Chloroform/Methanol-Extraktion

Kleine, extrem hydrophobe Membranproteine können statt mit Detergenzien auch mit organischen Lösungsmitteln solubilisiert werden. Die membrangebundene Untereinheit der ATP-Synthase/ATPase von *Escherichia coli* beispielsweise wurde bereits erfolgreich mit Chloroform/Methanol aus der Membran extrahiert (Fillingame, 1976), ebenso wie die c-Untereinheit der ATP-Synthase/ATPase von *P. furiosus* (Mayer, 2014).

### 2.8.1 Puffer und Lösungen

Puffer			Lösungen	
I	25 mM Tris	pH 7,5	III Chloroform/Methanol	2/1 (v/v)
II	20 mM MES + 1 % OG	pH 5,5	IV Chloroform/Methanol/ H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	3/47/48 (v/v/v)

### 2.8.2 Durchführung

40 g Zellen wurden in 80 ml ‚Ffm‘ Lysepuffer gelöst, mit einer French Press aufgeschlossen und einer differentiellen Zentrifugation unterzogen (Kap. 2.6.1). Die Membranen wurden nach der Ultrazentrifugation mit einem geringen Volumen (ca. 5 ml) Puffer I in eine 250 ml Duranglasflasche (Schott, Mainz) überführt. Das 20fache Volumen Lösung III wurde zugegeben und die Suspension für 20 – 24 Stunden auf Eis gerührt. Nach Filtration durch einen Faltenfilter, bei der bräunlich gefärbte Membranreste im Filter zurückblieben, wurde das geklärte Filtrat mit dem 0,2fachen Volumen H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> versetzt und nochmals für 20 – 24 Stunden auf Eis gerührt. Anschließend wurde, um die Phasentrennung zu beschleunigen, für 10 Minuten bei 4000 g und 4°C zentrifugiert (Beckmann Avanti J-25, Rotor JLA 16.250 von Beckmann Coulter, Palo Alto, CA, USA). Die organische, untere Phase wurde in einen 250 ml Scheidetrichter (Brand, Wertheim) überführt und mit dem 0,5fachen Volumen Lösung IV gewaschen. Nach erfolgter Phasentrennung wurde dieser Vorgang wiederholt. Anschließend wurde die organische Phase in einem Rundkolben (Lenz Laborglas, Wertheim) auf Eis mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt und tropfenweise Methanol zugegeben, bis die Lösung klar war. Die Lösungsmittel wurden mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (Büchi Labortechnik, Essen) im lauwarmen Wasserbad verdampft und der Rückstand in 1,5 ml Lösung III aufgenommen.

Alternativ fand für angereicherte *N. equitans*-Zellen ein modifiziertes Protokoll Anwendung, bei welchem geringere Zellmassen eingesetzt werden konnten. 1 – 2 g Zellen wurden in 30 ml ‚Ffm‘ Lysepuffer gelöst und nach dem Aufschluss mit der French Press für 15 Minuten



bei 4°C und 5000 g zentrifugiert (Beckmann Avanti J-25, Rotor JA 25.50 von Beckmann Coulter, Palo Alto, CA, USA), um grobe Zellbestandteile abzutrennen. Anschließend wurden die Membranen in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Optima LE-80K, Rotor 70Ti von Beckmann Coulter, Palo Alto, CA, USA) bei 45000 UpM (150000 g) und 4°C für 2 Stunden sedimentiert. Die Membranen wurden in insgesamt 2 ml Puffer I aufgenommen und in einem konischen 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) ad 8 ml mit Lösung III aufgefüllt. Daraufhin wurde für 20 – 24 Stunden bei 4°C in einem Überkopfschüttler (RM-2L, ELMI, Riga, Lettland) inkubiert. Nach Filtration durch einen Faltenfilter wurde das Filtrat mit dem 0,2fachen Volumen H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> versetzt und nochmals für 20 – 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Zur beschleunigten Phasentrennung wurde für 15 Minuten bei 4°C und 2000 g zentrifugiert (Beckmann Avanti J-25, Rotor JA 10 mit Einsatz für konische 50 ml-Zentrifugenröhrchen von Beckmann Coulter, Palo Alto, CA, USA). Die organische, untere Phase wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (Büchi Labortechnik, Essen) im lauwarmen Wasserbad eingedampft und der Rückstand in 300 µl Lösung III aufgenommen. Zur Abtrennung von in der Lösung verbliebenen Lipiden sowie zur Aufkonzentrierung der Proteine wurden diese mit Diethylether gefällt. Hierzu wurde der Extrakt mit dem 4fachen Volumen Diethylether versetzt und über Nacht auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 10000 UpM und -9°C (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau) wurde der Überstand verworfen und das Proteinpellet in einem kleinen Volumen (ca. 0,5 ml) Lösung III suspendiert.

Für biochemische Analysen wurden die extrahierten Proteine in eine wässrige Phase überführt. Der Extrakt wurde mit dem gleichen Volumen Puffer II versetzt und gemischt. Anschließend wurde die organische Phase unter leichtem Stickstoffstrom verdampft bis die Lösung klar war. Durch das im Puffer II enthaltene Detergenz blieben die Proteine in Lösung.

## 2.9 Chromatographische Enzymreinigung

### 2.9.1 Puffer

	Gelfiltrationspuffer	AEX-A	AEX-B
Tris/AMPSO/HEPES	25 mM	25 mM	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl	200 mM	-	1 M
Glycerin	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
DDM	0,05 % (w/v)	0,05 % (w/v)	0,05 % (w/v)
PMSF	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM

Je nach Anwendung wurden verschiedene Puffersubstanzen mit unterschiedlichen pH-Werten eingesetzt. Tris-Puffer wurden mit konzentrierter HCl auf pH 8,0 eingestellt, AMPSO-Puffer mit 5 M NaOH auf pH 9,0 und HEPES-Puffer mit 5 M NaOH auf pH 7,0.

	<b>AEX Step 1, 5,5 mS/cm</b>	<b>AEX Step 2, 9,0 mS/cm</b>	<b>AEX Step 3, 12,5 mS/cm</b>	<b>AEX Step 4, 16,0 mS/cm</b>
Tris/AMPSO/HEPES	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl	ca. 60 mM	ca. 100 mM	ca. 175 mM	ca. 220 mM
Glycerin	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
DDM	0,05 % (w/v)	0,05 % (w/v)	0,05 % (w/v)	0,05 % (w/v)
PMSF	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM

Die Leitfähigkeit (in mS/cm) wurde mit Hilfe eines Leitfähigkeitsmessgerätes (WTW LF 530, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) bei definierter Umgebungstemperatur (18°C) eingestellt. Die Puffer AEX-A und AEX-B wurden zunächst über Nacht auf die Umgebungstemperatur equilibriert und dann zur Einstellung der Leitfähigkeit gegeneinander titriert.

## 2.9.2 Säulen

Alle Säulen wurden vorgepackt von der Firma GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) bezogen. Gemäß den Herstellerangaben wurden sie jeweils vor und nach dem Gebrauch mit 1 M NaCl und H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> oder 0,5 M NaOH und H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> gewaschen. Vor dem Auftrag der Probe wurden die Säulen mit dem jeweiligen Puffer (AEX-A für Anionenaustauschersäulen und Gelfiltrationspuffer für Gelfiltrationssäulen) equilibriert. Die Säulen wurden in 20 % Ethanol gelagert.

<b>Anionenaustauscher</b>	<b>Volumen</b>	<b>Gelfiltration</b>	<b>Volumen</b>	<b>Trennbereich</b>
HiTrap Q HP	5 ml	HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR	320 ml	10 – 1500 kDa
		Superdex 200 10/300 GL	24 ml	10 – 600 kDa
		Superose 6 10/300 GL	24 ml	5 – 5000 kDa

## 2.9.3 Durchführung

Die chromatographische Reinigung der ATP-Synthase/ATPase wurde mit Hilfe des ÄKTA Chromatographiesystems (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das System wurde mit der Software Unicorn

gesteuert. Es wurde bei 4°C mit der Anlage ÄKTA *purifier* gearbeitet, welche mit einer UV-Messzelle, einer Leitfähigkeitsmesszelle, einem Frac950-Fraktionssammler und einer P960-Probenpumpe ausgestattet war.

Für den Auftrag auf eine Anionenaustauschersäule wurde die Probe mit Auftragspuffer (AEX-A) 1:10 verdünnt, um die Saccharose- bzw. Salzkonzentration herabzusetzen, und filtriert (Porengröße 0,45 µm), um Schwebstoffe zu entfernen. Vor dem Auftrag auf eine Gelfiltrationssäule wurde die Proteinlösung auf bis zu 10 mg/ml aufkonzentriert, so dass das Auftragsvolumen maximal 1 % des Säulenvolumens betrug.

Während der Chromatographie wurde die Absorption in der UV-Messzelle bei 280 nm gemessen, wodurch ein Rückschluss auf die Proteinkonzentration möglich war.

Bei der Anionenaustauschchromatographie mit der Säule HiTrap Q HP wurde nach einem spezifisch für die Reinigung der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* entwickelten Schema vorgegangen (Küper, 2010), welches im Verlauf dieser Arbeit hinsichtlich der Leitfähigkeit der Puffer optimiert wurde (Abb. 2.1). Nach Probenauftrag mit einem 50 ml Superloop und einem Waschschrift zur Entfernung von nicht gebundenem Protein wurde zur Elution die Leitfähigkeit der Puffer stufenweise erhöht. Hierzu wurden die Puffer manuell gewechselt, während der Gradient von AEX Step 3 auf AEX-B programmiert wurde.

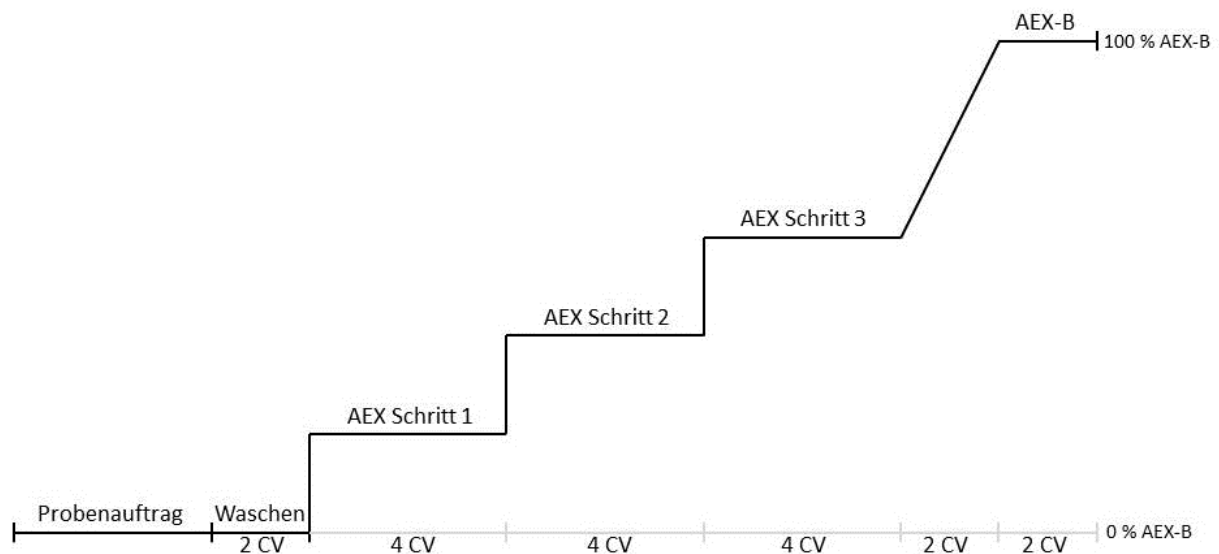


Abb. 2.1 Probenauftrags- und Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie

## 2.10 Proteinfällung

Um die ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* anzureichern, wurde die Tatsache genutzt, dass Proteine durch lineare Polymere wie Polyethylenglykol (PEG) ohne Denaturierung reversibel gefällt werden können. Zur Fällung diente hierbei PEG mit einer

durchschnittlichen Molekülmasse von 6000 (PEG 6000), da dieses als gut geeignet für die Fällungsreaktion beschrieben wurde (Polson et al., 1964).

### **2.10.1 Probenvorbereitung**

Vorbereitend für die Fällung wurden die Membranen aus dem Saccharosegradienten (Kap. 2.6.2.2) einmal gewaschen, um die Saccharose zu entfernen. Dazu wurde die Probe mit AMPSO Lysepuffer mindestens 1:5 verdünnt und die Membranen bei 45000 UpM (150000 g) und 4°C für 2 Stunden sedimentiert (Beckmann Optima LE-80K, Rotor 70Ti, Beckmann Coulter, Palo Alto, CA, USA). Nach Homogenisierung der Membranen in Lysepuffer erfolgte die Solubilisierung wie in Kapitel 2.7 beschrieben. Um überschüssiges DDM aus der Probe zu entfernen, wurde das Solubilisat in einem Vivaspin Zentrifugenröhrchen auf etwa 1/10 des Ausgangsvolumens aufkonzentriert, wobei die DDM-Mizellen mit einer Größe von etwa 70 kDa bei einem MWCO (molecular weight cut-off) von 100 kDa im Durchlauf zu finden sein sollten. Daraufhin wurde das Konzentrat mit AMPSO Lysepuffer wieder 1:10 verdünnt.

### **2.10.2 Fällung mit PEG 6000**

Es wurde eine Stammlösung von 50 % (w/v) PEG 6000 in AMPSO Lysepuffer hergestellt und der pH-Wert mit 5 M NaOH wieder auf pH 9,0 titriert. Bei Raumtemperatur wurden in der Proteinlösung in einem 5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) Konzentrationen zwischen 2 und 15 % (v/v) PEG 6000 eingestellt. Die Zugabe erfolgte tropfenweise, wobei das Reaktionsgefäß nach jeder Zugabe sorgfältig gemischt wurde. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 30 Minuten bei 10000 g und 20°C zentrifugiert (Centrifuge 5430R, Rotor FA-45-16-17, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand (Ü) wurde abgenommen und für weitere Fällungen oder biochemische Analysen herangezogen. Das sedimentierte Protein (Pellet, P) wurde in AMPSO Lysepuffer gelöst und ebenfalls biochemisch analysiert.

## **2.11 Vernetzung und Fixierung von Proteinen**

Gereinigte Proteinkomplexe wurden mit den chemischen Fixierungsmitteln Formaldehyd bzw. Glutaraldehyd versetzt. Die dadurch entstehenden kovalenten Bindungen zwischen Crosslinker und Protein sollen die Proteinkomplexe stabilisieren und einer Dissoziation in Subkomplexe vorbeugen.

### 2.11.1 Crosslinking

Die Probenlösung wurde auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt. 200 µl der Proteinlösung wurden mit 10 µl Glutaraldehydlösung (2,5 % (v/v) in H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub>) versetzt, was einer Endkonzentration von ca. 0,125 % (v/v) entsprach. Nach Inkubation für 5 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 1 M Tris, pH 9,0 gestoppt und die Probe bei 4°C kalt gestellt.

### 2.11.2 GraFix

Bei der so genannten GraFix-Methode (Kastner et al., 2007; Stark, 2010) werden Proteinkomplexe schonend fixiert, indem sie langsam in einen Dichtegradienten mit steigender Konzentration eines Crosslinkers einwandern. Dadurch wird eine Aggregatbildung und intermolekulare Vernetzung verhindert.

Mit Hilfe eines Gradientenmischers (Eigenbau der Mechanikwerkstatt Biologie, Universität Regensburg) wurden Saccharosegradienten von 10 – 30 % (w/v), 50 – 80 % (w/v) und 20 – 70 % (w/v) hergestellt. Die höher konzentrierte Saccharoselösung wurde dabei mit jeweils 0,1 % (v/v) Glutaraldehyd bzw. Formaldehyd versetzt, so dass im Dichtegradienten ein Konzentrationsgefälle von 0 – 0,1 % (v/v) entstand. Zusätzlich wurde zur Kontrolle ein Gradient hergestellt, der keinen Crosslinker enthielt. Die Gradienten wurden mit je ca. 100 µg Protein beladen und für 18 – 21 Stunden bei 35000 UpM (90000 g) und 4°C in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Optima LE-80K, Rotor SW41, Beckmann Coulter, Palo Alto, CA, USA) zentrifugiert. Bei Gradienten von 50 – 80 % (w/v) wurde die Temperatur auf 10°C erhöht, um ein Kristallisieren der Saccharose zu verhindern. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Gradienten mit Hilfe einer langen Kanüle und einer peristaltischen Pumpe von unten nach oben zu je ca. 1 ml fraktioniert. Vorhandene Pellets wurden im jeweiligen Puffer resuspendiert.

## 2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

### 2.12.1 BCA-Test

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) wurden, entsprechend den Angaben des Herstellers, 1 Volumen Lösung A und 1/50 Volumen Lösung B gemischt. Die fertige Reaktionslösung enthielt Cu<sup>2+</sup> und Bicinchoninsäure.

$\text{Cu}^{2+}$  wird durch Proteine zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, welches mit Bicinchoninsäure einen violett gefärbten Komplex bildet.

In einer Mikrotiterplatte (Rotilabo Mikrotest-Platten, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurden je 10  $\mu\text{l}$  Probe bzw. Proteinstandard im Doppelansatz mit je 200  $\mu\text{l}$  Reaktionslösung gemischt und für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  unter leichtem Schütteln inkubiert. Als Proteinstandard diente BSA in Konzentrationen von 0 bis 2,0 mg/ml.

Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm mit Hilfe eines Infinite M200 Pro Plateraders (Tecan Austria GmbH, Österreich), welcher über die Software Magellan (V 7.1) gesteuert wurde.

### **2.12.2 Nanodrop 280 nm**

Zur Abschätzung der Proteinkonzentration von bereits gereinigten Proteinlösungen wurde ein Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) eingesetzt. Die Steuerung erfolgte über die Software ND-1000 V3.8.0. Diese Methode basiert auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren im nahen UV-Bereich bei 280 nm. Durch Anwesenheit von Verunreinigungen, insbesondere von Nukleinsäuren, kann diese gestört werden, weshalb sie nicht für Rohextrakte eingesetzt wurde.

Nach Reinigung der Kontaktflächen des Gerätes mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  wurde  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  als Leerwert (Blank) gemessen. Dann wurden nacheinander die zu bestimmenden Proteinlösungen gemessen, wobei je 1,5  $\mu\text{l}$  Probe eingesetzt wurde und die Kontaktflächen zwischen den Messungen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  gereinigt wurden.

## **2.13 Messung der Enzymaktivität**

### **2.13.1 Nachweis der ATP-Hydrolyseaktivität**

#### **2.13.1.1 ATPase In-Gel-Assay**

Dieser Test wurde mit Nativgelen aus der CNE (Kap. 2.14.1.3) durchgeführt. Durch ATPase-Aktivität freigesetztes ortho-Phosphat bildet mit Blei(II)nitrat einen weißlichen Niederschlag, der sich an den aktiven Banden im Gel ablagert.

**Reaktionspuffer, pH 8,3**

Tris	35 mM
Glycin	270 mM
MgSO <sub>4</sub>	14 mM
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,2 % (w/v)
ATP-Dinatriumsalz	8 mM

Der pH-Wert wurde vor der Zugabe von Magnesiumsulfat und Bleinitrat mit konzentrierter HCl eingestellt. Das ATP wurde separat gelöst und kurz vor Testbeginn zugegeben.

Die Inkubation des Gels im Reaktionspuffer erfolgte unter Schütteln in einem Inkubator (Heraeus, Hanau) mit Schüttelinsatz (Mechanikwerkstatt Biologie, Universität Regensburg) für 30 – 45 Minuten bei 80°C. Sobald weiße Banden sichtbar waren, wurde die Reaktion abgebrochen, das Gel mit H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> gewaschen und das Ergebnis dokumentiert.

### 2.13.1.2 ,Quicktest', ,Longtest' und Hemmstofftest

#### 2.13.1.2.1 Puffer und Lösungen

**Reaktionspuffer, pH 8,0/pH 9,0/pH 7,0 (eingestellt mit KOH)**

Tris/AMPSO/HEPES	100 mM/100 mM/50 mM
MES	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> / K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	40 mM
KCl	200 mM

**AAM (acetone-acid-molybdate)**

Aceton p.a.	2 Teile
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2,5 M	1 Teil
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 10 mM	1 Teil

#### 2.13.1.2.2 Durchführung

Der so genannte ,Quicktest' dient dem qualitativen Nachweis der ATP-Hydrolyseaktivität und somit der raschen Identifizierung von aktiven Fraktionen beispielsweise nach einer Chromatographie. Hierzu wurden je 250 µl Reaktionspuffer in 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) vorgelegt. Je 8 µl ATP-Dinatriumsalz, ultrapur (100 mM) und 0,5 – 8 µl Probe wurden an die Gefäßwand pipettiert. Zur Bestimmung der physikalischen Hydrolyse von ATP wurde eine Kontrolle, der keine Enzymlösung zugesetzt wurde, mitgeführt. Die Reaktion wurde durch kurzes Abzentrifugieren (Galaxy Mini Zentrifuge, VWR, Darmstadt) und sofortige Inkubation in einem Heizblock (AkkuBlock Digital Dry Bath, Labnet International Inc., Woodbridge, NJ, USA) gestartet. Es wurde für 25 Minuten bei 92°C inkubiert, wobei dies einer Temperatur von 90°C im Reaktionsgefäß entsprach (Hlady, 2007). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde erneut kurz abzentrifugiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde der Phosphatnachweis durchgeführt (siehe unten).

Mit dem so genannten ‚Longtest‘ ließ sich die ATP-Hydrolyseaktivität quantifizieren. Es wurden je 1200 µl Reaktionspuffer in 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) vorgelegt und die Probelösung (max. 50 µl) zugegeben. Parallel wurde ein Ansatz ohne Probe mitgeführt, der zur Bestimmung der physikalischen Hydrolyse von ATP diente. Anschließend wurde jeder Ansatz 7 Minuten in einem Heizblock (Techne Dri-Block DB-2D, Techne Ltd., Cambridge, UK) bei 92°C inkubiert. Nach dieser Zeit hatte der Gefäßinhalt die gewünschte Temperatur von 90°C erreicht. Dann wurden je 60 µl ATP-Dinatriumsalz, ultrapur (100 mM) zugegeben, kurz gemischt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA) und sofort ein Volumen von 200 µl entnommen. Diese Probe wurde in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß mit 40 µl Stopplösung (30 % TCA) gegeben, welches dann ebenfalls gemischt wurde. Dies entsprach der Probennahme zum Zeitpunkt  $t = 0$  Minuten. Ebenso wurden zu den Zeitpunkten  $t = 3, 6, 9$  und  $12$  Minuten je 200 µl Probe entnommen und die Reaktion auf oben beschriebene Weise gestoppt. Die Stoppgefäße wurden bei 13000 UpM für 3 Minuten zentrifugiert (Microcentrifuge MC-13, Rotor 3324, Heraeus, Osterode). Danach wurde mit dem Überstand der Phosphatnachweis durchgeführt (siehe unten). Standardmäßig wurde jede Probe im Zwei- oder Dreifachansatz untersucht.

Mit dem ‚Longtest‘ konnte auch die Wirkung von ATPase-Hemmstoffen auf die ATP-Hydrolyseaktivität untersucht werden. Hierzu wurden die Hemmstoffe DES (Diethylstilbestrol), DCCD (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid) und TBT-Oxid (Bis(tributyltin)oxid) jeweils in Konzentrationen zwischen 0,1 und 1,5 mM (in Ethanol absolut gelöst) eingesetzt. Als Referenz für 0 mM Hemmstoffkonzentration wurde reiner Ethanol mit einem Volumen, das dem der höchsten Hemmstoffkonzentration entsprach, verwendet. Es wurde ad 1200 µl Reaktionspuffer sowie eine entsprechende Menge Enzym (ca. 1 µg gereinigtes Enzym, ca. 10 µg ungereinigte Proteine) zugegeben und gemischt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA). Anschließend wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach der ‚Longtest‘ wie oben beschrieben durchgeführt.

Der Nachweis von freiem Phosphat in den Reaktionslösungen aus ‚Quick‘- und ‚Longtest‘ erfolgte nach Heinonen & Lahti, 1981. Es wurde je 1 ml AAM in Halbmikroküvetten vorgelegt und je 200 µl zu testende Lösung zugegeben. Nach Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 355 nm in einem Photometer (Genesys 10 vis, Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA) gemessen. Hierbei diente im ‚Quicktest‘ die Kontrolle ohne Enzym als Leerwert. Im ‚Longtest‘ wurde der Nullabgleich mit einer Küvette, die AAM und Reaktionspuffer enthielt, durchgeführt.



## 2.13.2 Nachweis der Hydrogenaseaktivität

### 2.13.2.1 Hydrogenase In-Gel-Assay

Dieser Test wurde mit Nativgelen nach der CNE (siehe 2.14.1.3) durchgeführt und beruht auf der Reduktion von Methylenblau zu Leukomethylenblau durch die Aktivität von Hydrogenasen.

	Puffer I, pH 8,5	Puffer II, pH 8,5
Tris	200 mM	100 mM
Methylenblau	2,5 mM	-

Die pH-Werte der Puffer wurden mit konzentrierter HCl eingestellt.

Die Puffer wurden in Duranglasflaschen (Schott, Mainz) abgefüllt, die mit Gummistopfen und Schraubdeckel mit Loch verschlossen wurden. Anschließend wurde der Sauerstoff durch Durchgasen von Puffer I mit N<sub>2</sub> und von Puffer II mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, v/v) ausgetrieben. Dies bewirkte gleichzeitig eine Sättigung von Puffer II mit Wasserstoff.

Die Durchführung des Hydrogenase-Aktivitätstests erfolgte unter anaeroben Bedingungen (Anaerobenkammer von COY Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA). Das Gel wurde zunächst für 40 Minuten in Puffer I inkubiert und auf diese Weise mit Methylenblau gefärbt. Anschließend wurde zweimal mit Puffer II gewaschen und das Gel für 20 Minuten bei 80°C in Puffer II inkubiert. Hydrogenaseaktivität wurde durch eine Entfärbung des Gels an den entsprechenden Stellen angezeigt. Das Ergebnis wurde sofort dokumentiert.

### 2.13.2.2 Qualitativer Hydrogenasenachweis

Der qualitative Hydrogenasetest diente der schnellen Identifizierung von Fraktionen mit Hydrogenaseaktivität, beispielsweise nach der chromatographischen Reinigung. Hydrogenasen haben die Fähigkeit, Benzylviologen zu reduzieren, welches im oxidierten Zustand farblos und im reduzierten Zustand blau-violett ist.

Reaktionspuffer, pH 8,0 (eingestellt mit HCl)	
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM
Benzylviologen	5 mM

In einem 8 ml Reaktionsröhrchen (Pyrex-Borosilikatglas) wurden 500 µl Reaktionspuffer mit 10 µl Probenlösung gemischt. Das Röhrchen wurde mit Gummistopfen und Schraubkappe verschlossen und für 5 Minuten mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, v/v) durchgast. Nach 10-minütiger

Inkubation bei 85°C in einem Wasserbad (Haake L Fisons, Haake, Karlsruhe) zeigte eine deutliche Blaufärbung das Vorhandensein einer Hydrogenase an.

## 2.14 Gelelektrophoretische Verfahren

### 2.14.1 Gelelektrophorese

#### 2.14.1.1 SDS-PAGE nach Lämmli, 1970

##### 2.14.1.1.1 Puffer

<b>Trenngel-Puffer, pH 8,8</b>	<b>Sammelgel-Puffer, pH 6,8</b>	<b>Laufpuffer, pH 8,3</b>	<b>Auftragspuffer 6x, pH 6,8</b>
Tris 1,5 M	Tris 0,5 M	Tris 25 mM	Tris 350 mM
SDS 0,4 % (w/v)	SDS 0,4 % (w/v)	Glycin 192 mM	Glycerin 30 % (v/v)
		SDS 0,1 % (w/v)	SDS 10 % (w/v)
			β-Mercaptoethanol 10 % (v/v)
			Bromphenolblau 0,02 % (w/v)

Die pH-Werte wurden mit konzentrierter HCl eingestellt. Sammel- sowie Trenngelpuffer wurden vor Gebrauch filtriert (Porengröße 0,2 µm).

##### 2.14.1.1.2 Durchführung

Die verwendeten Gele hatten eine Größe von 10 x 8 cm und eine Dicke von 1 mm. Sammel- und Trenngel setzten sich nach folgendem Schema (für je 2 Gele) zusammen.

	<b>Trenngel, 10 %</b>	<b>Sammelgel, 5,7 %</b>
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	8,33 ml	4,8 ml
Sammelgel-Puffer	-	1,5 ml
Trenngel-Puffer	5 ml	-
Acrylamid, 30 %	6,67 ml	1,5 ml
APS, 10 % (w/v)	200 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl

APS und TEMED wurden erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugegeben.

Die Proben (bis zu 30 µg Protein) wurden mit Auftragspuffer versetzt und in einem Wasserbad (Haake L Fisons, Haake, Karlsruhe) bei 95°C für 25 Minuten denaturiert. Vom Proteinstandard (PageRuler prestained Protein Ladder) wurden jeweils 5 µl aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde in einem Mini-Protean Tetra System (BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA) durchgeführt. Sie lief zunächst für 20 Minuten bei 20 V pro Gel und anschließend für etwa 4 Stunden mit bis zu 60 V pro Gel.

### 2.14.1.2 SDS-PAGE nach Schägger, 2006

#### 2.14.1.2.1 Puffer

Schägger Gelpuffer 3x, pH 8,45		Anodenpuffer, pH 8,9		Kathodenpuffer, pH 8,25		Auftragspuffer 3x, pH 6,8	
Tris	3 M	Tris	100 mM	Tris	100 mM	Tris	150 mM
SDS	0,3 % (w/v)			Tricin	100 mM	Glycerin	36 % (v/v)
				SDS	0,1 % (w/v)	SDS	12 % (w/v)
						$\beta$ -Mercaptoethanol	6 % (v/v)
						Serva Blau G	0,03 % (w/v)

Die pH-Werte wurden mit konzentrierter HCl eingestellt. Der pH-Wert des Kathodenpuffers lag bei etwa pH 8,25 und wurde nicht durch Zugabe von Säure oder Lauge verändert.

#### 2.14.1.2.2 Durchführung

Die Gele hatten eine Größe von 20 x 18 cm und eine Dicke von 1,5 mm. Sie wurden in einer Perfect Blue Cast-It Gelgießstation (PeqLab Biotechnologie, Erlangen) gegossen. Trenn- und Sammelgel setzten sich folgendermaßen zusammen, wobei je nach Anwendung unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen für das Trenngel eingesetzt wurden.

	Trenngel, 15 %	Trenngel, 12 %	Sammelgel, 4 %
Acrylamid, 30 %	15,0 ml	17,1 ml	1,6 ml
Schägger Gelpuffer 3x	9,0 ml	14 ml	3,4 ml
Glycerin, 50 % (v/v)	5,6 ml	8,95 ml	-
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	0,4 ml	2,8 ml	7,0 ml
APS, 10 % (w/v)	150 $\mu$ l	200 $\mu$ l	100 $\mu$ l
TEMED	50 $\mu$ l	70 $\mu$ l	10 $\mu$ l

APS und TEMED wurden erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugegeben.

Die Proben (bis zu 30  $\mu$ g Protein) wurden mit Auftragspuffer versetzt und für 25 Minuten bei 95°C in einem Wasserbad (Haake L Fisons, Haake, Karlsruhe) denaturiert. Vom Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder) wurden jeweils 10  $\mu$ l aufgetragen.

Der Lauf erfolgte in einer Perfect Blue Maxi Twin Elektrophoresekammer (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) über Nacht bei 4°C zunächst für 2 Stunden bei 60 V, 30 mA

und 5 W und anschließend für ca. 14 Stunden bei 95 V, 75 mA und 150 W. Bei Bedarf wurden die Parameter auf 200 V, 150 mA und 200 W erhöht.

### 2.14.1.3 *Clear Native* Elektrophorese (CNE)

Die native Gelelektrophorese diente zur Auftrennung von Proteinkomplexen ohne vorherige Denaturierung (Wittig & Schägger, 2005; Chung et al., 2008).

#### 2.14.1.3.1 Puffer

Anodenpuffer, pH 7,0		Kathodenpuffer, pH 7,25	
Imidazol	25 mM	Imidazol	7,5 mM
		Tricin	50 mM

AB-Mix		Gelpuffer nativ, pH 7,0		Auftragspuffer 10x	
Acrylamid	48,5 % (w/v)	BisTris	150 mM	Glycerin	50 % (v/v)
Bisacrylamid	1,5 % (w/v)	$\epsilon$ -Aminocapronsäure	1,5 M	Ponceau S	0,1 % (w/v)
		DDM	0,05 % (w/v)		

Die pH-Werte von Anodenpuffer und Gelpuffer wurden mit konzentrierter HCl eingestellt. Der pH-Wert des Kathodenpuffers lag bei etwa pH 7,25 und wurde nicht durch Zugabe von Säure oder Lauge verändert. Sowohl AB-Mix als auch Gelpuffer wurden vor Gebrauch filtriert (Porengröße 0,2  $\mu$ m).

#### 2.14.1.3.2 Durchführung

Mit Hilfe eines Gradientenmischers (Eigenbau der Mechanikwerkstatt Biologie, Universität Regensburg) wurde in einer Perfect Blue Cast-It Gelgießstation (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) ein Gradientengel (5 – 13 %) gegossen. Ein Gel hatte eine Größe von 20 x 18 cm und eine Dicke von 1,5 mm und setzte sich folgendermaßen zusammen.

	Trenngel, 13 %	Trenngel, 5 %	Sammelgel, 4 %
AB-Mix	5,5 ml	2,1 ml	1,2 ml
Gelpuffer nativ	7 ml	7 ml	4 ml
Glycerin, 50 % (v/v)	8,4 ml	-	-
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	-	11,8 ml	6,7 ml
APS, 10 % (w/v)	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

APS und TEMED wurden erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugegeben. Während des Gießens wurden die Lösungen ständig gerührt (Magnetrührer MR3001, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim).

Es wurden bis zu 30 µg Protein, mit Auftragspuffer versetzt, pro Geltasche aufgetragen. Vom Größenstandard (HMW, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) wurden 10 µl aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 300 V, 5 mA pro Gel und 50 W in einer Perfect Blue Maxi Twin Elektrophoresekammer (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) mit Wasserkühlung (4°C).

#### 2.14.1.4 2D-Native/SDS-PAGE

Zur Analyse der Zusammensetzung von Proteinkomplexen aus der nativen Gelelektrophorese wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und in 1 % SDS (w/v) inkubiert. Die so vorbehandelten Banden wurden zwischen zwei Glasplatten (20 x 20 mm) mit 1 mm-Spacern in eine Perfect Blue Cast-It Gelgießstation (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) eingespannt. Anschließend wurde ein 12 % SDS-Gel nach Schagger (siehe 2.14.1.2) luftblasenfrei gegossen, wobei die Gelstücke im Sammelgel platziert waren. Für den Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot), von dem 10 µl aufgetragen wurden, wurde mit Hilfe eines Spacers eine Tasche im Gel freigehalten.

Der Lauf erfolgte über Nacht in einer Perfect Blue Maxi Twin Elektrophoresekammer (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) mit Wasserkühlung (4°C) zunächst für 2 Stunden bei 60 V, 30 mA und 5 W und anschließend für ca. 16 Stunden bei 95 V, 75 mA und 150 W.

### 2.14.2 Färben von Gelen

#### 2.14.2.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung diente als standardmäßige Detektionsmethode von Proteinen im Acrylamidgel und als Kontrolle des Gelelektrophorese-Laufes.

	Färbereagenz	Entfärbereagenz
Ethanol (techn.)	25 % (v/v)	25 % (v/v)
Essigsäure	5 % (v/v)	5 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R250	0,1 % (w/v)	-

Das Gel wurde für 15 – 20 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurde das Gel so lange sanft in Entfärbereagenz geschüttelt, bis der Hintergrund komplett entfärbt war. Für ein optimales Ergebnis wurde das Gel über Nacht in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  aufgenommen.

## 2.14.2.2 Silberfärbung

### 2.14.2.2.1 Durchführung

Zur Detektion geringer Proteinmengen im Gel wurde die Silberfärbung herangezogen. Die Durchführung erfolgte entweder nach einem klassischen (Blum et al., 1987) oder nach einem abgewandelten Protokoll (Shevchenko et al., 1996), welches chemische Modifizierungen der Proteine minimiert und deshalb mit massenspektrometrischen Methoden besser kompatibel ist.

	klassisch		MS-kompatibel	
	Reagenz	Dauer	Reagenz	Dauer
<b>Fixieren</b>	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure 0,037 % (v/v) Formaldehyd	1 – 1,5 h	Methanol/Essigsäure/ $\text{H}_2\text{O}$ 45/5/45 (v/v/v)	1 – 1,5 h
<b>Waschen</b>	50 % (v/v) Ethanol	3 x 10 min	$\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$	1 h
<b>Blockieren</b>	0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	1 min	0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	1 – 2 min
<b>Waschen</b>	$\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$	3 x 20 sec	$\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$	2 x 1 min
<b>Färben</b>	0,2 % (w/v) $\text{AgNO}_3$ 0,028 % (v/v) Formaldehyd	45 – 60 min	0,1 % (w/v) $\text{AgNO}_3$	40 – 60 min
<b>Waschen</b>	$\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$	3 x 20 sec	$\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$	2 x 1 min
<b>Entwickeln</b>	9 % (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ 1/50 Vol. Blockierlösung 0,019 % (v/v) Formaldehyd	bis Banden sichtbar	0,04 % (v/v) Formaldehyd in 2 % (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$	bis Banden sichtbar
<b>Stoppen</b>	50 % (v/v) Essigsäure	15 min	1 % (v/v) Essigsäure	15 min
<b>Waschen</b>	$\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$	3 x 1 min	$\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$	30 min

### 2.14.2.2.2 Entfärben

Für die massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen aus einem Silber-gefärbten Gel wurden die ausgeschnittenen und zerteilten Gelstücke entfärbt, um Silberionen zu entfernen (Gharahdaghi et al., 1999). Hierzu wurden Lösung 1 (30 mM  $C_6FeK_3N_6$ ) und Lösung 2 (100 mM  $Na_2S_2O_3$ ) im Verhältnis 1 + 1 gemischt. Die Inkubation der Gelstücke in je 50  $\mu$ l der Arbeitslösung erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde mehrmals mit je 200  $\mu$ l  $H_2O_{Millipore}$  gewaschen, bis die Gelstücke klar waren. Nach einer Inkubation in  $H_2O_{Millipore}$  über Nacht bei 4°C und einem weiteren Waschschrift waren die Gelstücke ausreichend entfärbt.

## 2.15 Proteinidentifikation

### 2.15.1 Massenspektrometrische Methoden: MALDI-TOF MS/MS

Eine Möglichkeit zur Identifizierung gereinigter Proteine bietet der so genannte Peptidmassenfingerprint (peptide mass fingerprinting). Dazu werden Proteine im Polyacrylamidgel mit sequenzspezifischen Proteasen gespalten und die Spaltprodukte nach Extraktion aus dem Gel mittels MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight) massenspektrometrisch untersucht. Die erhaltenen Peptidmassen werden mit einer Datenbank abgeglichen (Thiede et al., 2005).

Die Probenvorbereitung erfolgte folgendermaßen:

Aus über Nacht in  $H_2O_{Millipore}$  eingelegten SDS-Gelen wurden die interessierenden Banden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und zur Vergrößerung der Oberfläche in Würfel mit ca. 1 mm Kantenlänge zerkleinert. Zusätzlich wurde ein etwa gleich großes Gelstück ohne Protein ausgeschnitten, welches als Negativkontrolle diente. Im Falle eines Silber-gefärbten Gels wurden die Gelstückchen zunächst entfärbt (Kap. 2.14.2.2.2). Anschließend wurden sie in 2 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt und in einem Überkopfschüttler (RM-2L, ELMI, Riga, Lettland) folgenden Waschschriften unterzogen.

	Volumen	Dauer
50 mM $NH_4HCO_3$	je 0,5 ml	je 30 min
50 mM $NH_4HCO_3$ / Acetonitril (3/1)		
25 % Acetonitril (v/v)		
50 % Acetonitril (v/v)		

Anschließend wurden die Gelstückchen für 1 bis 2 Stunden lyophilisiert (Lyophylle Beta 1-16, Christ, Osterode).

Die Spaltung mit Trypsin bzw. Chymotrypsin erfolgte über Nacht bei 37°C. Die Endkonzentration der Protease betrug 2 µg/100 µl Gelvolumen in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, wobei maximal das 1,5fache des Gelvolumens an Puffer zugegeben wurde.

Anschließend wurde bei 37°C mit folgenden Schritten extrahiert.

	Volumen	Dauer
100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	je 2 – 3faches Gelvolumen	je 1 – 2 h
100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>		
100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> / Acetonitril (1/1)		

Die Extrakte wurden in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) vereinigt und über Nacht lyophilisiert. Der trockene Rückstand wurde in je 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> aufgenommen und nochmals für 3 bis 4 Stunden lyophilisiert.

Die massenspektrometrische Analyse der gewonnenen Peptide wurde freundlicherweise von Eduard Hochmuth (Lehrstuhl für Biochemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Deutzmann, Universität Regensburg) an einem 4700 Proteomics MALDI-TOF MS/MS-Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Der Datenbankabgleich erfolgte mit Hilfe des Suchprogramms Mascot ([http://www.matrixscience.com/help/pmf\\_help.html](http://www.matrixscience.com/help/pmf_help.html)).

### 2.15.2 Immunologische Methoden: Western-Blot

Um Proteine mit spezifischen Antikörpern identifizieren zu können, mussten sie zunächst auf eine Trägermembran übertragen werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.

#### 2.15.2.1 Wetblot

Towbin Transfer Puffer (nach Towbin et al., 1979)	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 % (v/v)

Der Transferpuffer wurde jedes Mal frisch hergestellt und bis zur Verwendung bei 4°C oder auf Eis gelagert.

Der Transfer der Proteine wurde nach erfolgter Gelelektrophorese in einem Wetblot-System (Mini Trans Blot von BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA oder PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web M von PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt.

Der Aufbau einer Transfereinheit war folgendermaßen:



Schwamm, getränkt in Transferpuffer  
 2x Whatman Chromatography Paper, getränkt in Transferpuffer  
 Gel, equilibriert in Transferpuffer für 20 Minuten  
 PVDF- (Polyvinylidendifluorid-) Membran, aktiviert in Methanol für 7 Minuten  
 2x Whatman Chromatography Paper, getränkt in Transferpuffer  
 Schwamm, getränkt in Transferpuffer

Der Transfer erfolgte über Nacht bei 30 V, 90 mA (BioRad Apparatur) bzw. 40 V, 160 mA (PeqLab Apparatur) und 4°C unter Rühren.

Die Transfereffizienz konnte durch Färben der Membran mit 0,1 % Ponceau S (w/v)/ 5 % Essigsäure (v/v) überprüft werden. Mit H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> konnte überschüssiges Färbereagenz entfernt, und mit TBS-TT (siehe 2.15.2.3.1) die Membran wieder vollständig entfärbt werden. Des Weiteren konnte durch Färben des Gels mit Coomassie (siehe 2.14.2.1) überprüft werden, ob Proteine im Gel zurückgeblieben waren.

Nach erfolgreichem Transfer konnten Proteine auf der Membran mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (Kap. 2.15.2.3).

## 2.15.2.2 Dotblot

Beim Dotblot wurden Proteinlösungen ohne vorherige Gelelektrophorese direkt auf eine PVDF-Membran aufgetragen. Hierfür wurde die Membran zunächst für 7 Minuten in Methanol und anschließend für 5 Minuten in einer Lösung von 0,16 M NaOH in 40 % (v/v) Methanol inkubiert. Auf die noch feuchte Membran wurden Probenvolumina von 2 bis 12 µl aufgetragen und für ca. 1 Stunde luftgetrocknet. Nach Reaktivierung in Methanol konnte die Membran mit 0,1 % Ponceau S (w/v)/ 5 % Essigsäure (v/v) gefärbt und die Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert werden (Kap. 2.15.2.3).

## 2.15.2.3 Immundetektion

### 2.15.2.3.1 Puffer und Lösungen

	TBS, pH 8,0	TBS-TT, pH 8,0	Blockierlösung	
Tris	50 mM	20 mM	BSA in TBS-TT	1 % (w/v)
NaCl	150 mM	150 mM		
Tween 20	-	0,05 % (v/v)		
Triton X-100	-	0,5 % (v/v)		

Die pH-Werte der Puffer wurden mit konzentrierter HCl eingestellt.

#### **2.15.2.3.2 Durchführung**

Zur Sättigung der Membran mit Protein wurde sie für 2 Stunden bei 4°C in Blockierlösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 0,5 % BSA in TBS-TT über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Es folgten mehrere Waschschrte bei Raumtemperatur (3 x 10 – 15 Minuten in TBS-TT und 2 x 10 – 15 Minuten in TBS). Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur für 1 Stunde im Dunkeln. Anschließend wurde 3 x 10 Minuten mit TBS-TT gewaschen, wobei auch hier unter Ausschluss von Licht gearbeitet wurde. Zuletzt wurde die Membran in TBS aufgenommen.

Die Auswertung der Blots mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern erfolgte an einem Fujifilm FLA-5000 Scanner (Fujifilm, Düsseldorf) unter Verwendung des Filters Cy5 bei einer Wellenlänge von 635 nm und mit Hilfe der Programme Image Reader und AIDA. Wurde mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern gearbeitet, musste die Membran zunächst mit einer 1 + 1 Mischung der beiden Lösungen des Lumi-Light Western Blotting Substrate für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert werden. Dann konnte an einem Chemilumineszenzimager (LAS 3000, Fujifilm, Düsseldorf) mit Hilfe des Programms Image Reader LAS 3000 ausgewertet werden.

### **2.15.3 N-terminale Sequenzierung**

Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Proteinen ist der so genannte Edman-Abbau (Edman, 1970), bei dem jeweils die N-terminale Aminosäure eines Proteins abgespalten und das Aminosäurederivat über HPLC (high performance liquid chromatography) analysiert wird. So kann eine N-terminale Sequenz von bis zu 20 Aminosäuren bestimmt und das Protein in der Regel eindeutig identifiziert werden.

Zur Vorbereitung für die N-terminale Sequenzierung wurde die Probe in einer SDS-PAGE (Kap. 2.14.1.2) aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert (Kap. 2.15.2.1). Diese wurde mit Coomassie gefärbt. Die getrocknete Membran wurde an Eduard Hochmuth (Lehrstuhl für Biochemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Deutzmann, Universität Regensburg) zur Durchführung der Sequenzierung an einem Procize®492 Sequenziersystem (Applied Biosystems, Foster City, USA) übergeben.

## 2.16 Bioinformatische Analysen

Bioinformatische Analysen der Proteine wurden unter Zuhilfenahme folgender Programme/Datenbanken durchgeführt.

Programm/Datenbank	Referenz/URL
Clustal Omega	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>
ExPASy proteomics	<a href="http://www.expasy.org/proteomics">http://www.expasy.org/proteomics</a>
- compute pI/MW	<a href="http://web.expasy.org/compute_pi/">http://web.expasy.org/compute_pi/</a>
- TMPred	<a href="http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html">http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html</a>
JGI	<a href="http://jgi.doe.gov/">http://jgi.doe.gov/</a>
- IMG	<a href="https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/er/main.cgi">https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/er/main.cgi</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Phobius	<a href="http://phobius.sbc.su.se/">http://phobius.sbc.su.se/</a>
SOSUisignal	<a href="http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal_submit.html">http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal_submit.html</a>
TMHMM	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/</a>

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Versuche zur Reinigung der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* im Tris-Puffersystem bei pH 8,0

Aufbauend auf den Ergebnissen aus Küper, 2010 und Kreuter, 2010 wurden weitere Versuche zur Reinigung des ATP-Synthasekomplexes von *I. hospitalis* unternommen. Es wurde mit dem in den o. g. Arbeiten etablierten Puffersystem basierend auf Tris bei pH 8,0 gearbeitet. Der Zellaufschluss mittels French Press sowie der in Kreuter, 2010 etablierte Saccharose-Dichtegradient wurden standardmäßig eingesetzt. Da *I. hospitalis* ein mariner Organismus ist und diese oftmals eine hohe intrazelluläre Kaliumionen-Konzentration zur Osmoregulation gegenüber der salinen Umgebung aufweisen (Welsh, 2000), wurde zunächst die optimale Ionenart und -konzentration für die Aktivität und Stabilität der ATP-Synthase/ATPase ermittelt. Auf der Basis dieser Experimente wurden weitere Reinigungsversuche durchgeführt.

#### 3.1.1 Bestimmung der optimalen Ionenkonzentration

Im Rahmen einer begleitenden Bachelorarbeit wurde von Frau Pia Wiegmann der Einfluss von  $K^+$ - und  $Na^+$ -Ionen auf die Aktivität und die Stabilität der ATP-Synthase/ATPase untersucht (Wiegmann, 2011). In einem methodischen Vorversuch stellte sich  $K^+$  als dominierendes Kation im Reaktionspuffer als am besten geeignet heraus. Somit wurde in der Folge im Reaktionspuffer für die Aktivitätstests  $Na_2S_2O_5$  durch  $K_2S_2O_5$  ersetzt und der pH-Wert statt mit NaOH mit KOH eingestellt.

##### 3.1.1.1 Einfluss der Ionenkonzentration auf die Aktivität

Daraufhin wurden Tris-Lysepuffer mit verschiedenen Ionenkonzentrationen (5 mM KCl, 10 mM KCl, 10 mM NaCl oder ohne KCl/NaCl) für den Zellaufschluss mit French Press und die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt und die ATP-Hydrolyseaktivitäten verglichen. Für das Zelllysat wurde im Puffer ohne KCl bzw. NaCl die höchste spezifische Aktivität (1424 mU/mg) gemessen. Die Bande 2 aus dem Saccharosegradienten, in welcher die Membranen angereichert waren, zeigte die höchste spezifische Aktivität (3243 mU/mg)

ebenfalls im Puffer ohne KCl bzw. NaCl. Gleiches galt für die übrigen Proben des Reinigungsverlaufs. (Wiegmann, 2011).

In früheren Experimenten erfolgte der Zellaufschluss oftmals in Gelfiltrationspuffer, der neben 25 mM Tris und 10 mM  $\text{MgCl}_2$  noch 200 mM NaCl und 10 % Glycerin (v/v) enthielt. Um einen eventuell vorhandenen Einfluss der hohen NaCl-Konzentration bzw. des Glycerins nachzuweisen, wurden oben beschriebene Experimente in Tris-Lysepuffer mit 200 mM NaCl und 10 % Glycerin (v/v) bzw. nur mit 200 mM NaCl wiederholt. Da mit glycerinhaltigen Puffern keine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt werden konnte, wurden lediglich die ATP-Hydrolyseaktivitäten des Lysats bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Mit 1813 bzw. 1580 mU/mg lagen die Werte beider Puffer mit hohem Salzgehalt etwas über denen des Puffers ohne KCl bzw. NaCl, was vermutlich in erster Linie auf eine andere Zellcharge zurückzuführen ist. Somit konnte weder ein eindeutig positiver noch ein negativer Effekt von 200 mM NaCl bzw. 10 % (v/v) Glycerin auf die Aktivität belegt werden.

Puffer	200 mM NaCl	200 mM NaCl, 10 % Glycerin
spezif. Aktivität des Lysats in mU/mg	1813	1580

Tab. 3.1 Spezifische ATPase-Aktivitäten in verschiedenen Lysepuffern. Probe: Lysat

### 3.1.1.2 Einfluss der Ionenkonzentration auf die Stabilität

Parallel zur spezifischen Aktivität wurde auch die relative Aktivität nach Hemmung mit DCCD bzw. TBT-Oxid untersucht.

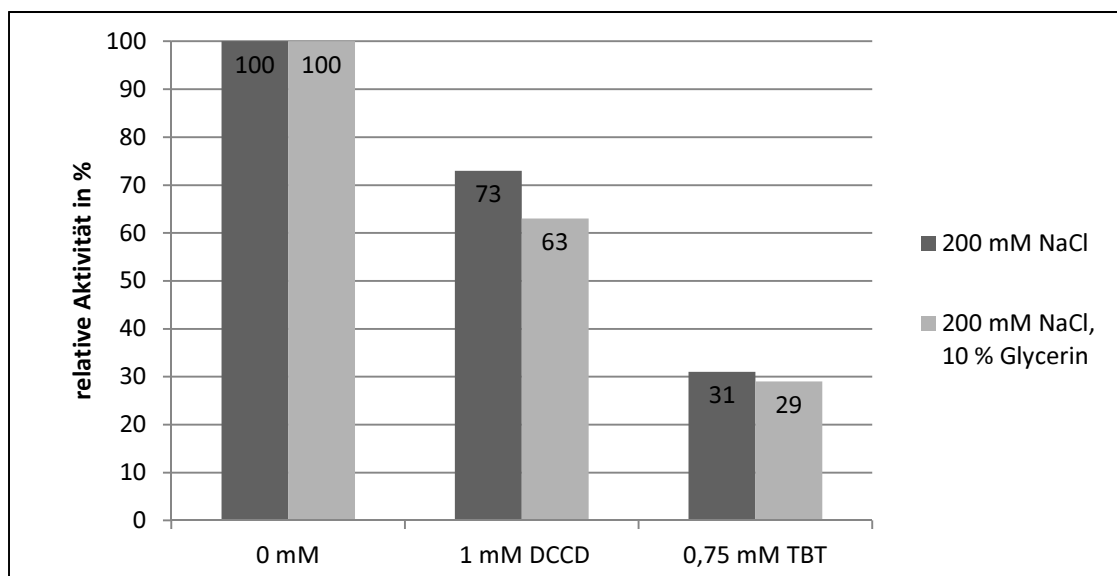


Abb. 3.1 Relative ATPase-Aktivitäten in verschiedenen Lysepuffern mit bzw. ohne Glycerin nach Hemmung mit DCCD bzw. TBT-Oxid. Probe: Lysat

In Wiegmann, 2011 konnte ein Rückgang der Aktivität durch 1 mM DCCD bzw. 0,75 mM TBT-Oxid festgestellt werden, der sich bei den verschiedenen Lysepuffern mit bzw. ohne KCl/NaCl

kaum unterschied (in Bande 2 20 – 35 % Restaktivität für DCCD und 0 – 3 % Restaktivität für TBT-Oxid). Analoge Ergebnisse ließen sich für das Lysat erzielen (39 – 63 % Restaktivität für DCCD und 17 – 39 % Restaktivität für TBT-Oxid).

Die Ergebnisse der Versuche mit Tris-Lysepuffern mit 200 mM NaCl sind in Abb. 3.1 3.1 dargestellt. Die Restaktivität lag nach Hemmung mit DCCD bei 73 bzw. 63 % und nach Hemmung mit TBT-Oxid bei 31 bzw. 29 %. Im Puffer mit Glycerin wurde also eine etwas bessere Hemmung erzielt als im Puffer ohne Glycerin. Der stabilisierende Effekt dieser Substanz ist bereits lange bekannt (Back et al., 1979), weshalb den in dieser Arbeit verwendeten Chromatographiepuffern grundsätzlich 10 % (v/v) Glycerin zugesetzt wurde.

### 3.1.2 Reinigung der ATP-Synthase/ATPase

Basierend auf den unter 3.1.1 beschriebenen Ergebnissen wurde für die Reinigung der ATP-Synthase/ATPase ein Lysepuffer ohne zusätzliche Salzzugabe verwendet. Da ATP-Synthasen/ATPasen divalente Kationen, optimalerweise  $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ , für ihre Funktion benötigen (Inatomi, 1986; Lingl et al., 2003; Mayer, 2014), enthielten alle verwendeten Puffer 10 mM  $MgCl_2$ . Nach einem Zellaufschluss durch French Press (Kap. 2.5.2) wurde die Auftragssuspension für einen Dichtegradienten hergestellt (Kap. 2.6.2.1).

#### 3.1.2.1 Saccharose-Dichtegradient

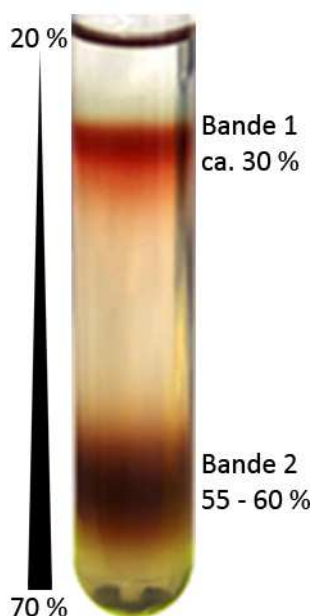


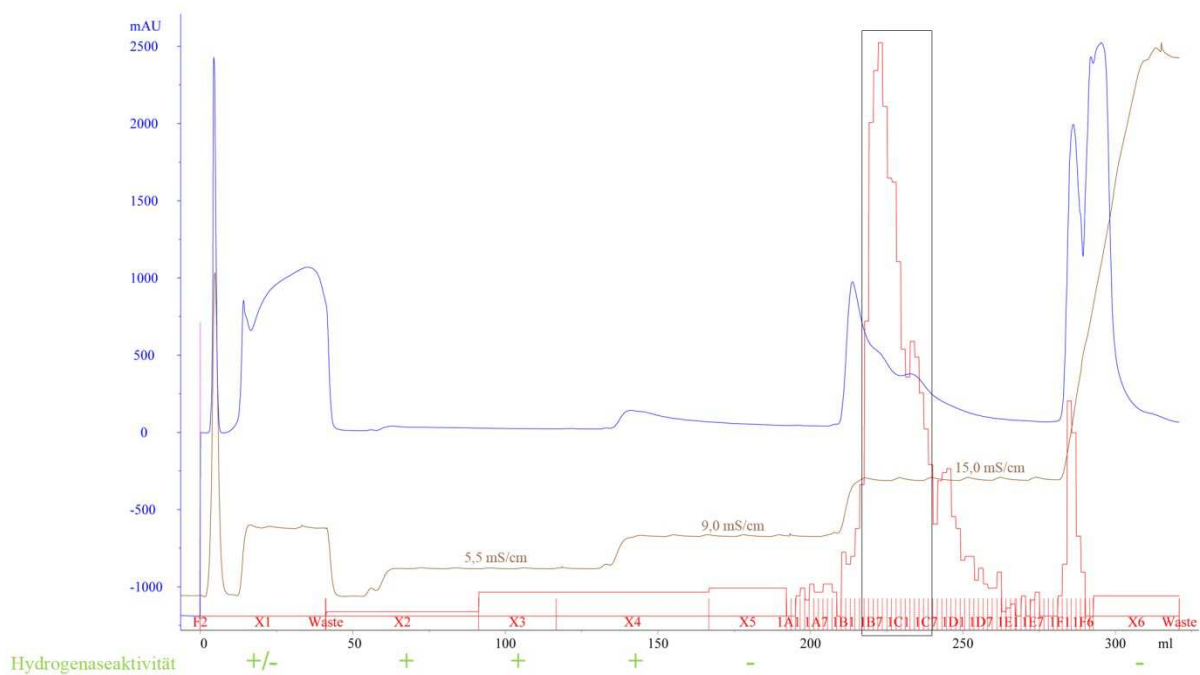
Abbildung 3.2 zeigt das Ergebnis der Ultrazentrifugation eines Dichtegradienten. Eine rötliche, klare Bande trat bei etwa 30 % Saccharose auf und wurde als Bande 1 bezeichnet. Eine weitere Bande, die bräunlich und trüb erschien, lief auf einer Höhe von 55 – 60 % Saccharose und wurde als Bande 2 bezeichnet. Darüber hinaus gab es ein Pellet am Boden des Röhrchens, in dessen Bodenschicht sich hellgelb gefärbte Schwefelreste befanden, während die darüber liegende Schicht eine dunkelbraune bis schwarze Farbe aufwies und nicht aufgeschlossenen Zellen enthielt.

Bande 2 enthielt im Lichtmikroskop bei 1000facher Vergrößerung sichtbare Partikel ( $< 1 \mu m$ ) und wurde nach der Entnahme für die Solubilisierung (Kap. 2.7) und anschließende Reinigung eingesetzt.

**Abb. 3.2 Saccharose-Dichtegradient**  
von *I. hospitalis* (20 – 70 %) bei pH 8,0

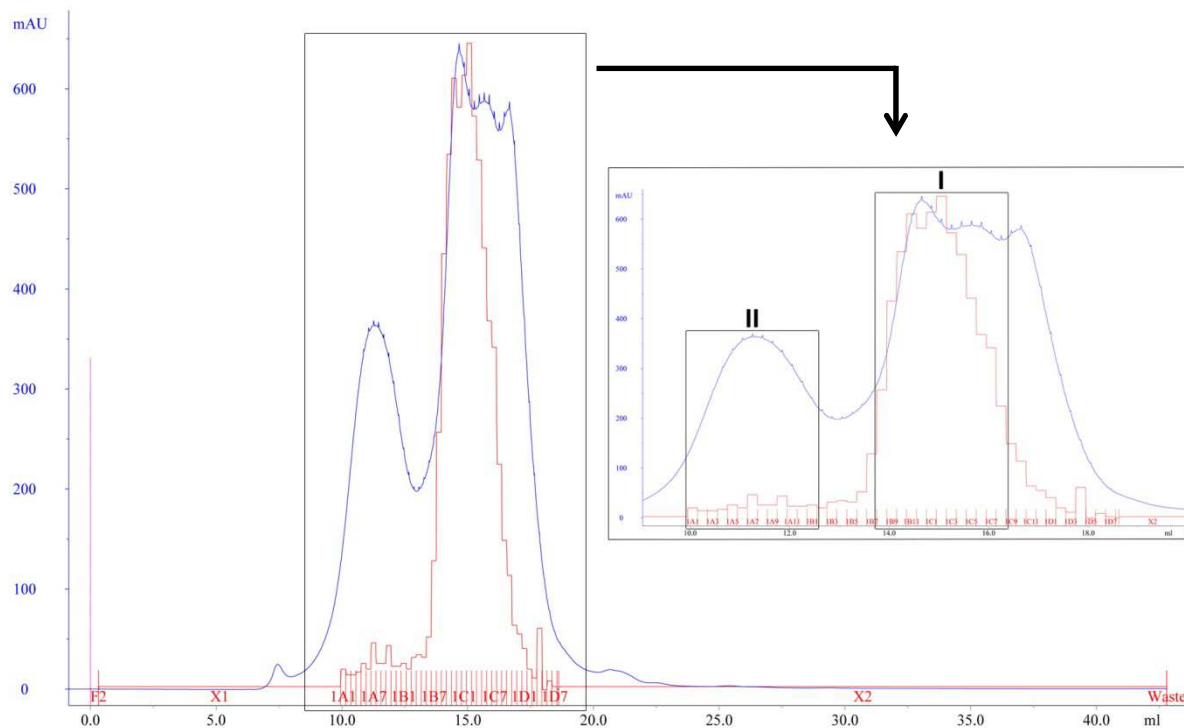
### 3.1.2.2 Chromatographische Reinigung und Analyse der Subkomplexe

Wie in früheren Experimenten gezeigt wurde, bindet die ATP-Synthase/ATPase gut an Anionenaustauscher (Küper, 2010). Die mit DDM solubilisierten Membranproteine aus Bande 2 wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von maximal 0,5 ml/min über einen 50 ml-Superloop auf drei in Reihe geschaltete Anionenaustauscher (HiTrap Q HP) aufgetragen. Die Elution erfolgte durch stufenweise Erhöhung der Leitfähigkeit, wobei die Puffer manuell gewechselt wurden. Mit jeder Erhöhung der Leitfähigkeit ging ein Peak der UV-Absorption einher (Abb. 3.3). Diese waren bei den ersten beiden Elutionsschritten (5,5 und 9,0 mS/cm) wenig ausgeprägt. Diese Fraktionen zeigten jedoch Hydrogenaseaktivität im qualitativen Nachweis und wurden gesammelt und an PD Dr. Arnulf Kletzin (TU Darmstadt) für Charakterisierungsstudien der Hydrogenasen weitergegeben. In Fraktionen des dritten Elutionsschritts mit 15,0 mS/cm sowie bei der finalen Stoßelution konnte ATPase-Aktivität gemessen werden. Das Aktivitätsmaximum bei 15 mS/cm lag nicht exakt deckungsgleich mit dem UV-Absorptionsmaximum, sondern leicht nach hinten versetzt auf einer Schulter der UV-Absorptionslinie. Die aktivsten Fraktionen wurden vereinigt und zeigten im Nativgel eine prominente Bande bei einer apparenten molekularen Masse von 440 kDa, die auch im ATPase In-Gel-Assay aktiv war (Abb. 3.5). Des Weiteren konnten mit der Coomassie-Färbung Banden mit großer apparenter molekularer Masse ( $\geq 669$  kDa) sowie bei ca. 66 kDa detektiert werden. Die vereinigten Fraktionen wurden aufkonzentriert und in eine Gelfiltrationschromatographie eingesetzt.



**Abb. 3.3 Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q HP) bei pH 8,0.** Fraktionsgröße 2 ml. Schwarz markiert sind die Fraktionen, die für die weitere Verarbeitung vereinigt wurden; blau (—): UV-Absorption bei 280 nm; braun (—): Leitfähigkeit; rot (—): ATP-Hydrolyseaktivität; grün: Hydrogenaseaktivität

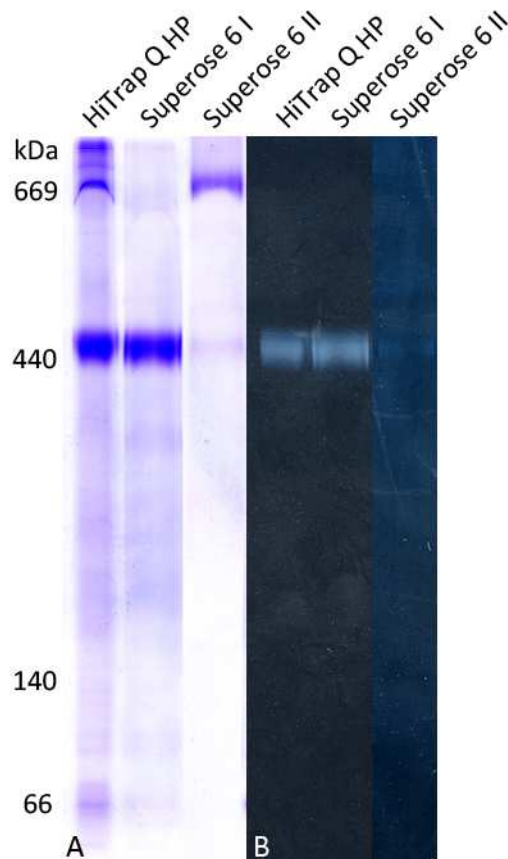
Die Gelfiltrationschromatographie mit einer Superose 6-Säule (Abb. 3.4) zeigte eine Anreicherung von ATP-hydrolysierenden Proteinen, deren UV-Absorptionspeak jedoch in direkter Nachbarschaft von zwei anderen Proteinpeaks lag. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und als Superose 6 I bezeichnet. Im Nativgel war hier lediglich eine Bande bei 440 kDa zu erkennen, die außerdem ATP-Hydrolyseaktivität im In-Gel-Assay zeigte (Abb. 3.5). Des Weiteren wurden in der Gelfiltration Proteine von größerer molekularer Masse separiert, die, obwohl sie kaum ATP-Hydrolyseaktivität zeigten, gesammelt und als Superose 6 II bezeichnet wurden. Sie zeigten im Nativgel eine prominente Bande bei ca. 669 kDa, die jedoch im ATPase In-Gel-Assay nicht aktiv war. Zusätzlich war eine schwache Bande bei 440 kDa zu sehen, die ein ebenfalls schwaches Signal im In-Gel-Assay zeigte (Abb. 3.5).



**Abb. 3.4 Chromatogramm der Gelfiltrationschromatographie (Superose 6) bei pH 8,0.** Fraktionsgröße 0,5 ml. Schwarz markiert ist der Vergrößerungsausschnitt sowie in selbigem die als Superose 6 I und II bezeichneten vereinigten Fraktionen. blau (—): UV-Absorption bei 280 nm; rot (—): ATP-Hydrolyseaktivität

Die Größe der Proteinkomplexe wurde auch über die Gelfiltration abgeschätzt. Nach den Herstellerangaben eluiert das Protein Thyroglobulin mit einer Molekülmasse von 669 kDa bei ca. 12 ml von der verwendeten Säule Superose 6, in etwa wie auch der Proteinpeak II. Ferritin mit einer Molekülmasse von 440 kDa dagegen eluiert bei ca. 14,5 ml, wie der Proteinpeak mit ATP-Hydrolyseaktivität. Dies stimmt gut mit der Größenabschätzung aus dem Nativgel überein.





**Abb. 3.5 CNE (5 – 13 %) der vereinigten Fraktionen aus den einzelnen Reinigungsschritten bei pH 8,0.** Je 20 µg Protein; A: Coomassie-Färbung; B: ATPase In-Gel-Assay

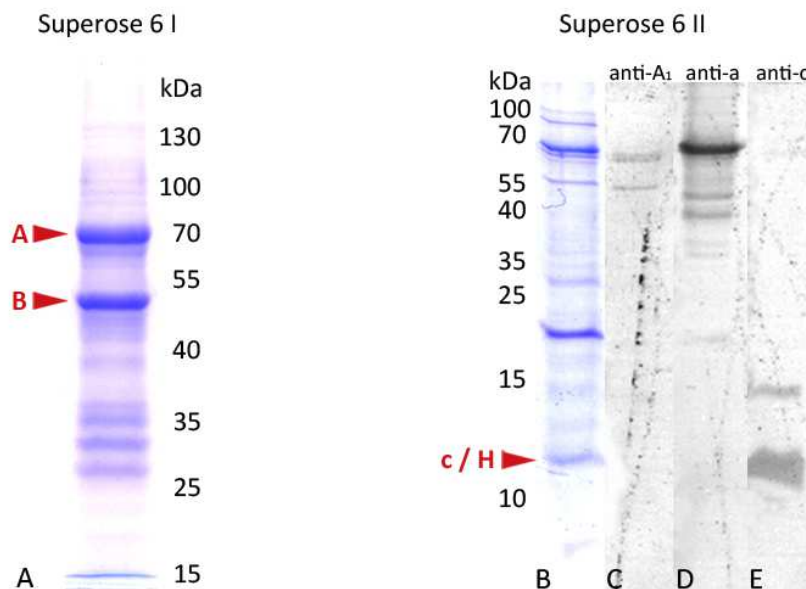
### 3.1.2.3 Identifizierung von Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase

Für die Untersuchung der Untereinheitenzusammensetzung der Proteinkomplexe aus der Gelfiltration wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Zusätzlich wurden einzelne Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF MS/MS analysiert. Da davon ausgegangen wurde, dass der Proteinkomplex bei 440 kDa den A<sub>1</sub>-Subkomplex darstellte, der in erster Linie die katalytischen Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase enthielt, wurde besonderes Augenmerk auf die Probe Superose 6 II gelegt, die einen Proteinkomplex von deutlich größerer apparanter molekularer Masse aufwies.

Der Proteinkomplex in der Probe Superose 6 I zeigte, wie erwartet, im SDS-Gel ein Bandenmuster ähnlich dem des A<sub>1</sub>-Subkomplexes aus früheren Arbeiten. Die beiden Untereinheiten A und B konnten hier mittels MALDI-TOF MS/MS eindeutig identifiziert werden.

Das Bandenmuster der Probe Superose 6 II wies markante Banden bei ca. 70 kDa, zwischen 15 und 25 kDa sowie zwischen 10 und 15 kDa auf. Mittels Western Blot konnten zwei schwache Banden bei ca. 55 und 70 kDa als Teil des A<sub>1</sub>-Subkomplexes identifiziert werden. Eine der prominenten Banden mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 70 kDa

reagierte stark mit dem Antikörper gegen die membranassoziierte Untereinheit a. Die Bande zwischen 15 und 25 kDa könnte die Untereinheiten D und/oder E repräsentieren. Darüber hinaus zeigten 2 Banden im Bereich von 10 – 15 kDa eine Reaktion mit dem Antikörper gegen die membranständige Untereinheit c und könnten deren Monomer und Dimer darstellen. In früheren Arbeiten konnte diese Untereinheit ausschließlich in Assoziation mit der Untereinheit a bei ca. 70 kDa nachgewiesen werden.



**Abb. 3.6 SDS-PAGE und Western Blots (WB) der vereinigten Fraktionen der Gelfiltration bei pH 8,0.** A: SDS-PAGE nach Lämmli (10 %), 20 µg Superose 6 I, Coomassie-Färbung; B – E: SDS-PAGE nach Schagger (12 %), je 30 µg Superose 6 II; B: Coomassie-Färbung; C: WB mit anti-atp A<sub>1</sub> (*I. hospitalis*, 1:5000); D: WB mit anti-atp a (rec) (*I. hospitalis*, 1:25000); E: WB mit anti-atp c (syn) (*I. hospitalis*, 1:1000); sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + DyLight 650 (1:2500); rot gekennzeichnet sind die durch Peptidmassen-Fingerabdruck identifizierte Untereinheiten

Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch Analysen mittels MALDI-TOF MS/MS. Nach Verdau mit Chymotrypsin wurde die Untereinheit c identifiziert (Ig<sub>ni</sub>\_0682; Score 202), nach Verdau mit Trypsin die Untereinheit H (Ig<sub>ni</sub>\_1215; Score 419, Scores von 200 oder mehr waren eindeutig). Trypsin spaltet Peptidbindungen C-terminal von Lysin und Arginin. Diese beiden basischen Aminosäuren treten in der Untereinheit H mehrfach auf, in Proteinen mit ausgedehnten hydrophoben Bereichen wie der Untereinheit c jedoch seltener. Aus diesem Grund konnte diese bislang nicht zuverlässig identifiziert werden. Die Protease Chymotrypsin spaltet C-terminal nach Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan sowie in geringerer Rate nach Leucin, Methionin, Alanin, Asparagin und Glutamin. Insbesondere unpolare Aminosäuren wie Leucin, Alanin und Methionin kommen in hydrophoben Proteinen wie der c-Untereinheit häufig vor, weshalb diese erst nach Verdau mit Chymotrypsin zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. In der Probe Superose 6 II waren demnach vor allem die membrangebundenen Untereinheiten a und c des A<sub>0</sub>-Subkomplexes, aber auch, in geringerem Ausmaß, Untereinheiten des A<sub>1</sub>-Subkomplexes vertreten.

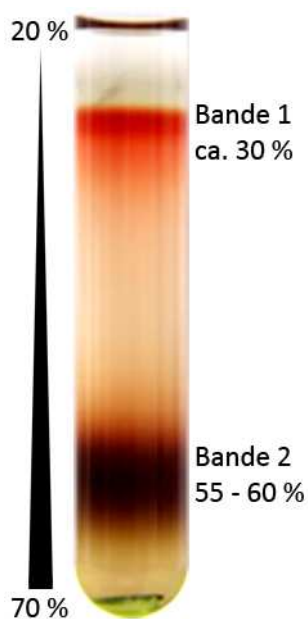
## 3.2 Versuche zur Reinigung des Gesamtkomplexes der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* im AMPSO-Puffersystem bei pH 9,0

Um herauszufinden, ob sich die Stabilität der ATP-Synthase/ATPase bei höherem pH-Wert verbessert, wurde die Puffersubstanz Tris durch AMPSO ersetzt und der pH-Wert jeweils auf 9,0 eingestellt. Dies kommt dem pH-Wert der natürlichen Umgebung der ATP-Synthase im IMC von *I. hospitalis* vermutlich am nächsten.

### 3.2.1 Methodische Vorarbeiten

Zur Klärung der Frage, ob die neue Puffersubstanz und der veränderte pH-Wert Einfluss auf bereits etablierte Methoden wie Dichtegradientenzentrifugation und ATPase-Aktivitätstests hatten, wurden diese vorab getestet.

#### 3.2.1.1 Saccharose-Dichtegradient



Der Dichtegradient im AMPSO-Puffersystem bei pH 9,0 (Abb. 3.7) wies keine signifikanten Unterschiede zu dem bei pH 8,0 (Abb. 3.2) auf. Nach erfolgter Ultrazentrifugation konnten zwei Banden identifiziert werden. Eine rötlich gefärbte, klare Bande befand sich bei etwa 30 % Saccharose (Bande 1) und eine bräunliche, trübe Bande trat bei 55 – 60 % Saccharose auf (Bande 2). Darüber hinaus war ein Pellet vorhanden, welches zum Teil hellgelb gefärbte Schwefelreste und zum Teil dunkelbraun gefärbte, nicht aufgeschlossene Zellen enthielt. Die bräunliche Bande 2 enthielt im Lichtmikroskop sichtbare Partikel ( $< 1 \mu\text{m}$ ) und wurde für die Solubilisierung (Kap. 2.7) eingesetzt.

**Abb. 3.7 Saccharose-Dichtegradient von *I. hospitalis* (20 – 70 %) bei pH 9,0**

#### 3.2.1.2 ATPase-Aktivitätstest und Hemmstofftest

Für den Vergleich der verschiedenen Puffersubstanzen und pH-Werte wurde die spezifische Aktivität im jeweiligen Reaktionspuffer mittels Longtest bestimmt. Als Probe diente ein im

AMPSO-Puffersystem bei pH 9,0 gereinigter A<sub>1</sub>-Subkomplex. Tabelle 3.2 zeigt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse.

Reaktionspuffer	Tris, pH 8,0	Tris, pH 9,0	AMPSO, pH 8,0	AMPSO, pH 9,0
spezif. Aktivität in mU/mg	15103	16394	13973	13981

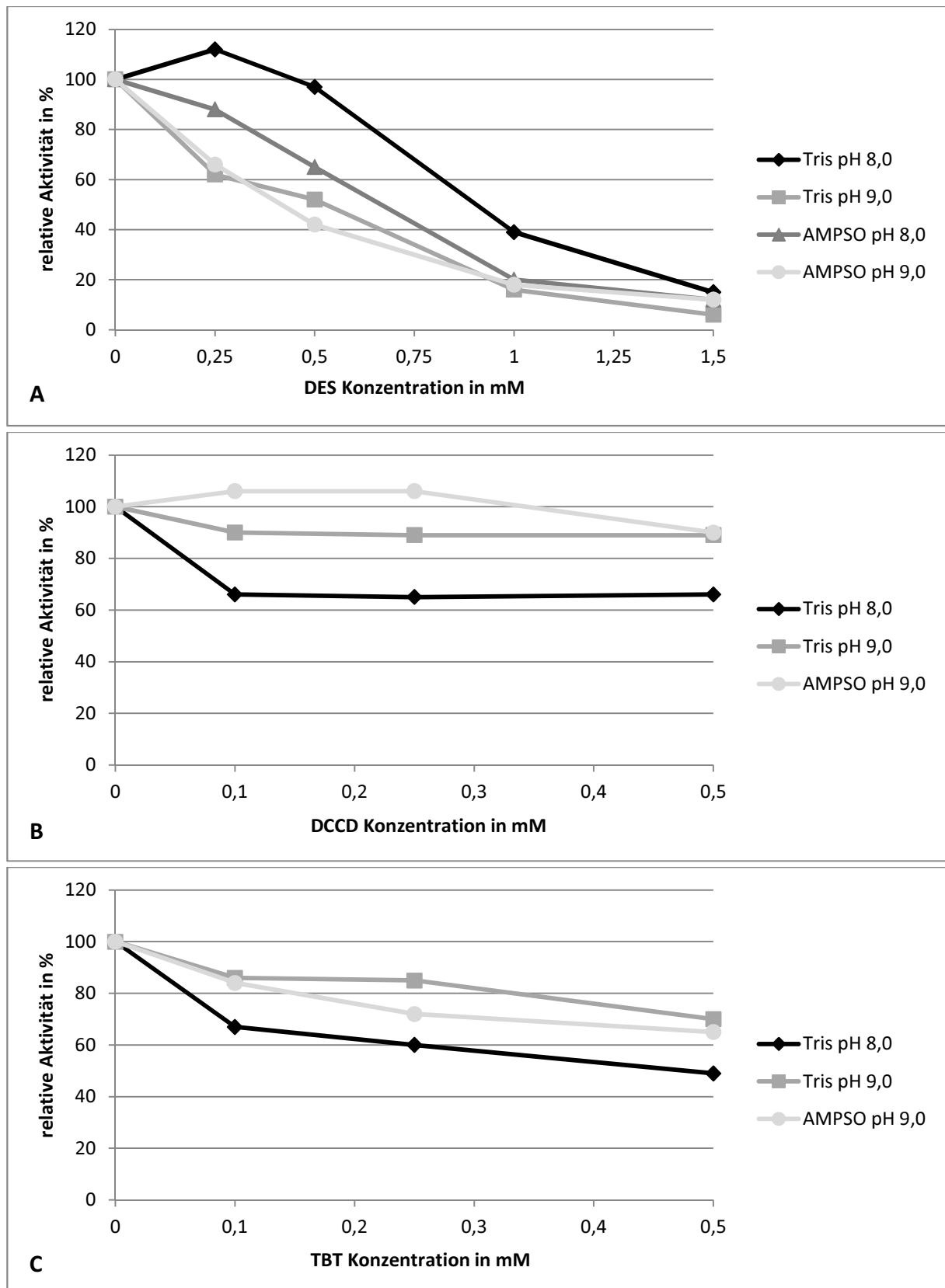
**Tab. 3.2 Spezifische ATPase-Aktivitäten in verschiedenen Reaktionspuffern und bei verschiedenen pH-Werten.** Probe: gereinigter A<sub>1</sub>-Subkomplex

Die absolute ATPase-Aktivität war in Tris pH 9,0 leicht erhöht gegenüber Tris pH 8,0, während ein Unterschied in AMPSO nicht erkennbar war. Obwohl die ATPase-Aktivität bei Verwendung von AMPSO statt Tris insgesamt niedriger war, entsprach sie in AMPSO bei pH 9,0 immer noch ca. 93 % des Wertes in Tris bei pH 8,0. Der pH-Wert und die Puffersubstanz hatten also im getesteten Bereich auf die absolute Aktivität nur einen geringen Einfluss.

Des Weiteren wurde die Wirksamkeit der standardmäßig eingesetzten Hemmstoffe DES, DCCD und TBT-Oxid in den verschiedenen Reaktionspuffern überprüft. Die jeweiligen Aktivitäten der Kontrollen ohne Hemmstoff wurden auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte entsprechend berechnet. In Abb. 3.8 sind die so ermittelten relativen Werte der ATP-Hydrolyse in verschiedenen Puffern gegen die jeweiligen Hemmstoffkonzentrationen aufgetragen.

Der Hemmstoff DES wurde in Konzentrationen von 0,25 bis 1,5 mM getestet. Als Testlösung diente hier ein im AMPSO-Puffersystem bei pH 9,0 gereinigter A<sub>1</sub>-Subkomplex. Bereits bei einer Konzentration von 0,25 mM konnte in fast allen Puffern ein leichter Rückgang der Aktivität beobachtet werden (Abb. 3.8 A). Eine Ausnahme war der Puffer Tris pH 8,0, bei dem dieser Wert etwas höher war als der Ausgangswert, wobei es sich hierbei vermutlich um einen Messfehler handelt. Insgesamt lagen bei diesem Puffer alle Werte höher als bei den übrigen Puffern, wobei sie sich mit steigender Hemmstoffkonzentration annäherten. Die minimale Restaktivität bei 1,5 mM DES lag je nach Puffer zwischen 6 und 15 %. Diese starke Hemmung war möglicherweise ein Artefakt der hohen Hemmstoffkonzentration, worauf der Kurvenverlauf der freigesetzten nmol P<sub>i</sub>/Zeit hindeutete (Grafik nicht gezeigt). Deshalb wurde DES bei weiteren Versuchen in einer Konzentration von 1,0 mM eingesetzt.

Die beiden Hemmstoffe DCCD und TBT-Oxid wurden jeweils in Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 mM getestet. Auf einen Test des Puffers AMPSO pH 8,0 wurde hier verzichtet. Da die Versuche mit einem Solubilisat (in AMPSO bei pH 9,0) und nicht mit einem gereinigten Enzym durchgeführt wurden, wurde bei jedem getesteten Puffer ein Ansatz mit 1 mM DES mitgeführt (Daten nicht gezeigt). So konnte die maximal erreichbare Hemmung abgeschätzt werden.



**Abb. 3.8 Relative ATPase-Aktivitäten in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration in verschiedenen Reaktionspuffern und bei verschiedenen pH-Werten.** A: Hemmstoff DES, Probe: gereinigter A<sub>1</sub>-Subkomplex; B: Hemmstoff DCCD, Probe: Solubilisat; C: Hemmstoff TBT-Oxid, Probe: Solubilisat

Mit DCCD wurde im Puffer Tris pH 8,0 die beste Hemmung erzielt (Abb. 3.8 B). Die Restaktivität lag bei einer Hemmstoffkonzentration von 0,25 mM bei 65 %. Damit war die Hemmwirkung fast so gut wie mit DES, bei welchem sich die Restaktivität auf 49 % belief. In beiden Puffern bei pH 9,0 konnte mit DCCD die Aktivität nur auf ca. 90 % gesenkt werden, wohingegen mit DES eine Hemmung auf bis zu 50 % Restaktivität möglich war.

Vergleichbare Ergebnisse konnten mit TBT-Oxid produziert werden (Abb. 3.8 C). Eine maximale Hemmung auf bis zu 49 % Restaktivität konnte mit 0,5 mM TBT-Oxid im Puffer Tris pH 8,0 erreicht werden. Mit DES wurde hier eine Hemmung von 46 % (54 % Restaktivität) erzielt. Die starke Hemmung durch 0,5 mM TBT-Oxid bei pH 8,0 stellt möglicherweise ein Artefakt der hohen Hemmstoffkonzentration dar, bei der die Proteine vermutlich denaturieren. Darauf deuteten Präzipitate im Reaktionsgefäß hin. In beiden anderen Puffern bei pH 9,0 war die Hemmung mit TBT-Oxid weniger ausgeprägt (max. 65 – 70 % Restaktivität). Mit DES konnte hier jedoch die Aktivität auf bis zu 56 % gesenkt werden.

Da in beiden Puffersystemen jeweils bei pH 9,0 eine schlechtere Hemmung beobachtet wurde als bei pH 8,0, ist davon auszugehen, dass die Reaktion pH-abhängig ist. Dementsprechend wurden beide Hemmstoffe, DCCD und TBT-Oxid, in allen weiteren, hier gezeigten Versuchen in einer Konzentration von 0,25 mM und in einem Reaktionspuffer basierend auf Tris bei pH 8,0 eingesetzt.

### 3.2.2 Chromatographische Reinigung

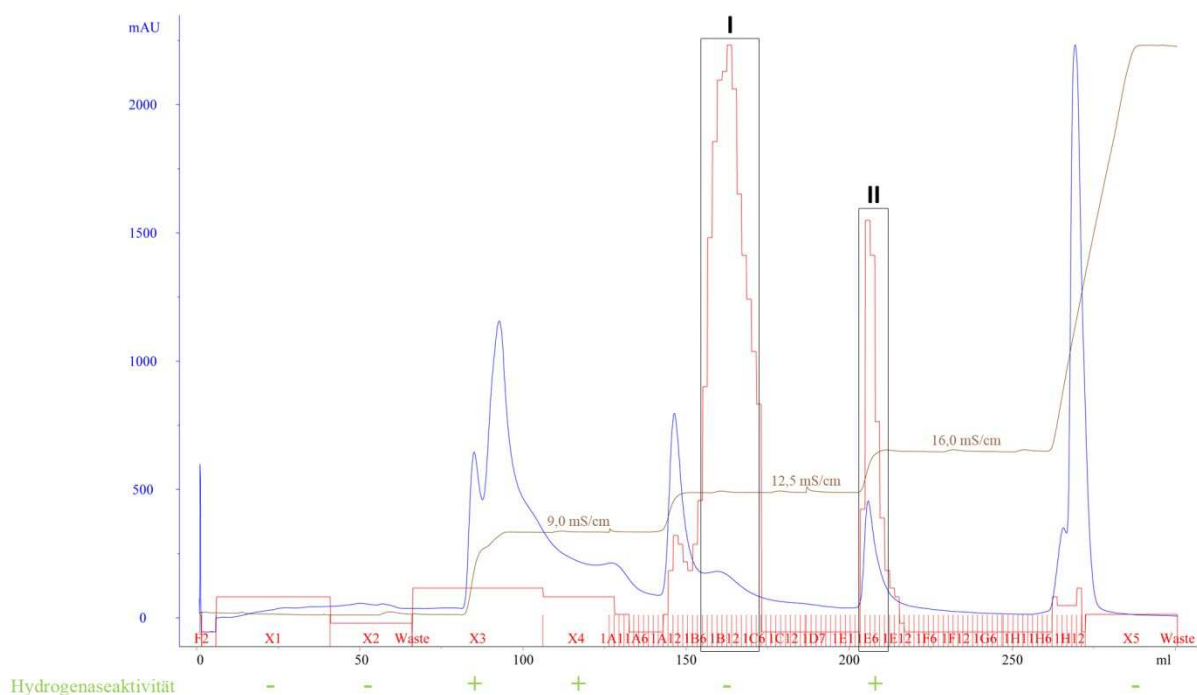
Die erstmalige chromatographische Reinigung im AMPSO-Puffersystem bei pH 9,0 erfolgte im Rahmen einer begleitenden Bachelorarbeit durch Frau Andrea Weinfurtnner (Weinfurtnner, 2012). Nach Zellaufschluss durch French Press, Saccharose-Dichtegradienten und Solubilisierung mit DDM wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Die Elution erfolgte wie beschrieben (Kap. 2.9.3) mit Puffern der Leitfähigkeit 5,5 mS/cm, 9,0 mS/cm und 15 mS/cm. Es ergaben sich zwei Probenpools mit ATPase-Aktivität, von denen der Pool 1 nach damaligem Stand der Kenntnisse wohl die gekoppelte ATP-Synthase enthielt. Diese Annahme basierte vor allem auf den Ergebnissen der Hemmstofftests, die jedoch in einem Reaktionspuffer mit AMPSO bei pH 9,0 durchgeführt wurden, da zu diesem Zeitpunkt die Versuche zur Wirksamkeit der Hemmstoffe DCCD und TBT bei verschiedenen pH-Werten noch fehlten.

#### 3.2.2.1 Anionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie

Zur besseren Reproduktion der Ergebnisse der Anionenaustauschchromatographie aus Weinfurtnner, 2012 wurde zunächst die Leitfähigkeit der eluierten Fraktionen genau bestimmt und angepasst. Diese ist stark temperaturabhängig und erhöht sich mit steigender

Temperatur, da dann die Beweglichkeit der Ionen zunimmt. Die Leitfähigkeit der vermeintlich bei 15 mS/cm eluierten Fraktionen mit ATP-Hydrolyseaktivität wurde unter definierten Temperaturbedingungen gemessen und belief sich auf einen tatsächlichen Wert von 12,5 mS/cm. Um die Trennung der beiden ATP hydrolysierenden Proteinkomplexe zu verbessern, wurden die Leitfähigkeiten aller weiteren Puffer entsprechend angepasst (9,0 bzw. 16,0 mS/cm).

Nach dem langsamen Auftrag des Solubilisats (maximal 0,5 ml/min) auf drei in Reihe geschaltete Säulen HiTrap Q HP erfolgte die Elution durch manuellen Pufferwechsel und damit schrittweise Erhöhung der Leitfähigkeit, gefolgt von einer finalen Stoßelution mit AEX-B (1 M NaCl). Dies resultierte in dem in Abb. 3.9 gezeigten Elutionsprofil.



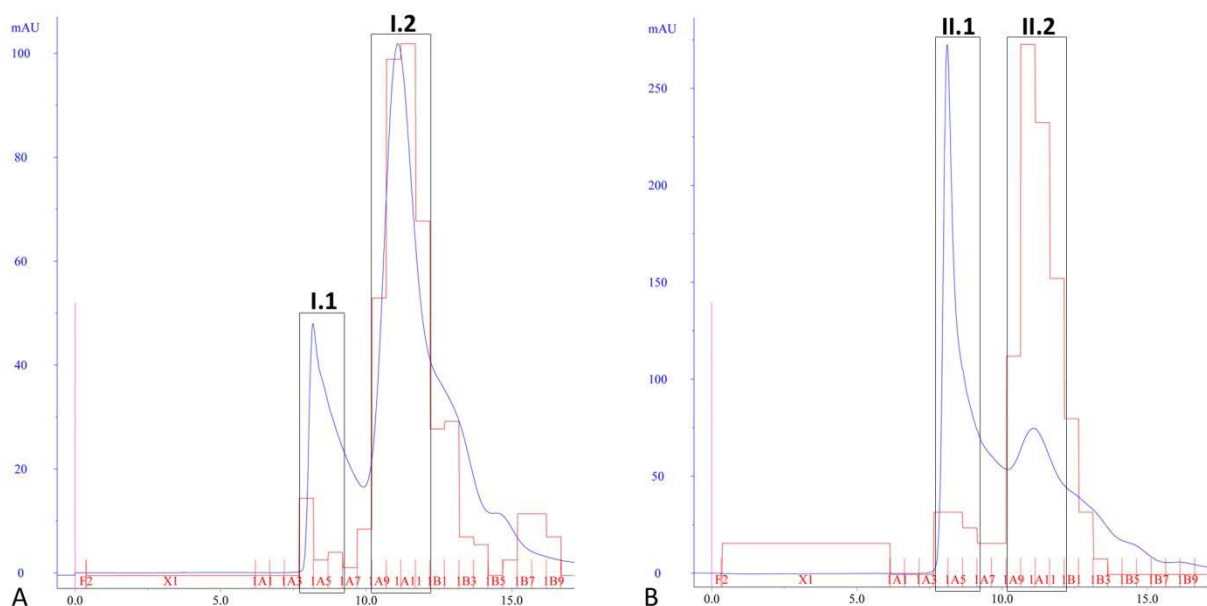
**Abb. 3.9 Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q HP) bei pH 9,0.** Fraktionsgröße 2 ml. Schwarz markiert sind die Fraktionen, die für die weitere Verarbeitung vereinigt wurden (HiTrap I und II); blau (—): UV-Absorption bei 280 nm; braun (—): Leitfähigkeit; rot (—): ATP-Hydrolyseaktivität; grün: Hydrogenaseaktivität

Mit der ersten Erhöhung der Leitfähigkeit auf 9,0 mS/cm wurden Proteine eluiert, die kaum ATP-Hydrolyseaktivität aber eine hohe Hydrogenaseaktivität besaßen. Diese Fraktionen wurden für Charakterisierungsstudien der Hydrogenasen an PD Dr. Arnulf Kletzin (TU Darmstadt) weitergegeben. Beim nächsten Elutionsschritt mit 12,5 mS/cm zeigte sich ein scharfer Proteinpeak, gefolgt von einer gut abgetrennten Schulter, die starke Hydrolyseaktivität aufwies. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereinigt und als HiTrap I bezeichnet. Mit der weiteren Erhöhung der Leitfähigkeit auf 16,0 mS/cm wurden Proteine eluiert, die ebenfalls starke ATP-Hydrolyseaktivität und darüber hinaus auch schwache Hydrogenaseaktivität zeigten. Diese Fraktionen wurden als HiTrap II vereinigt. Bei

der finalen Stoßelution wurden nochmals zahlreiche Proteine von der Säule gewaschen, die jedoch kaum ATP-Hydrolyseaktivität besaßen. Die ATPase-Aktivitäten von HiTrap I und II wurden quantifiziert, und HiTrap I wies mit 10215 mU/mg eine etwa doppelt so hohe spezifische Aktivität auf wie HiTrap II mit 5073 mU/mg.

Die beiden Proben HiTrap I und II wurden jeweils aufkonzentriert und auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200) aufgetragen. Die Trennung erfolgte mit dem identischen Programm für beide Proben bei einer Flussrate von 0,5 ml/min.

In beiden Chromatogrammen (Abb. 3.10) waren zwei prominente Proteinpeaks zu erkennen, von denen jeweils der erste bei einem Elutionsvolumen von etwa 8,5 ml auftrat, vergleichbar mit dem Protein Thyroglobulin mit 669 kDa, welches nach Herstellerangaben bei ca. 9 ml eluiert. Der erste Peak zeigte nur schwache ATP-Hydrolyseaktivität. Der jeweils zweite Proteinpeak trat bei etwa 11 ml in Erscheinung, was auf eine ähnliche Molekülmasse wie Ferritin mit 440 kDa schließen lässt. Er besaß starke ATP-Hydrolyseaktivität. Während bei der Reinigung von HiTrap I der erste Proteinpeak nur etwa halb so groß war wie der zweite (Abb. 3.10 A), war er bei der Reinigung von HiTrap II etwa dreimal so hoch (Abb. 3.10 B). Die Fraktionen beider Peaks wurden jeweils getrennt gesammelt und analysiert.



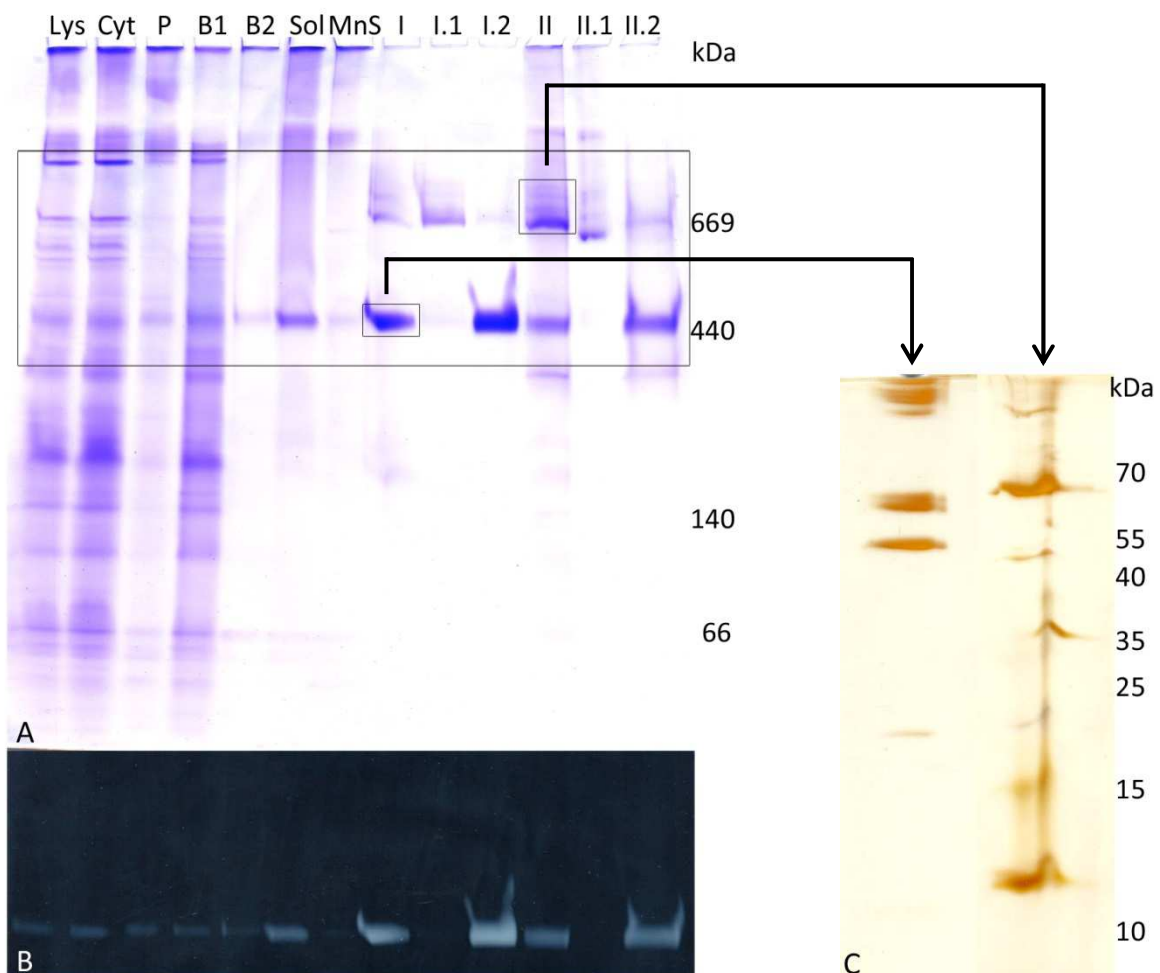
**Abb. 3.10 Chromatogramme der Gelfiltrationschromatographie (Superdex 200) bei pH 9,0.** A: HiTrap I; B: HiTrap II. Fraktionsgröße 0,5 ml. Schwarz markiert sind die im Folgenden als Superdex I.1 und I.2 bzw. II.1 und II.2 bezeichneten vereinigten Fraktionen. blau (—): UV-Absorption bei 280 nm; rot (—): ATP-Hydrolyseaktivität

### 3.2.2.2 Analyse der gereinigten Proteinkomplexe

Alle Fraktionen der Reinigung wurden in einem Nativgel aufgetrennt. Hier wurde die Anreicherung eines ATP hydrolysierenden Proteinkomplexes von etwa 440 kDa und eines Proteinkomplexes ohne ATP-Hydrolyseaktivität von etwa 669 kDa ersichtlich (Abb. 3.11 A



und B). Beide Komplexe waren sowohl in HiTrap I als auch in HiTrap II vorhanden, wobei in HiTrap I der 440 kDa-Komplex und in HiTrap II der 669 kDa-Komplex dominierte. Die Proteinkomplexe wurden in der Gelfiltration getrennt, so dass in Superdex I.1 und II.1 nahezu ausschließlich der 669 kDa-Komplex zu finden war. In Superdex I.2 und II.2 war der 440 kDa-Komplex stark angereichert, wobei in II.2 noch eine Bande bei 669 kDa sichtbar war. Aufgetrennt in einer SDS-PAGE (Abb. 3.11 C) zeigte der 440 kDa-Komplex einige Banden großer molekularer Masse bei deutlich über 70 kDa, zwei prominente Banden bei etwa 55 kDa sowie zwischen 55 und 70 kDa und zusätzlich eine schwache Bande zwischen 15 und 25 kDa. Die Auftrennung des 669 kDa-Komplexes resultierte in einem Schmier, aus dem jedoch besonders eine Bande bei etwa 70 kDa sowie eine Bande zwischen 10 und 15 kDa hervortraten.

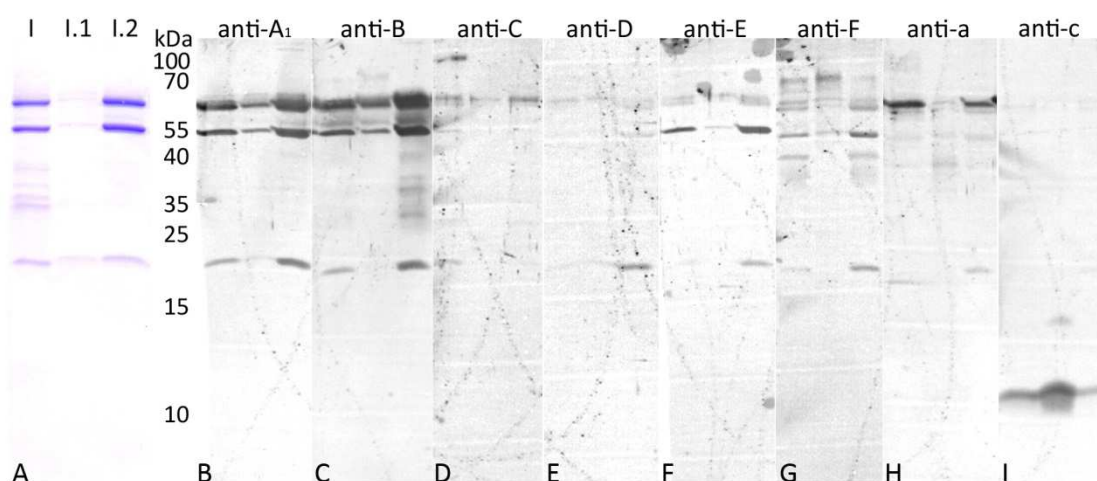


**Abb. 3.11 CNE des Reinigungsverlaufs bei pH 9,0 und Untereinheitenkomposition der angereicherten Proteinkomplexe.** Je 25 µg Protein (I.1 10 µg); A: CNE (5 – 13 %), Coomassie-Färbung; B: CNE (5 – 13 %), ATPase In-Gel-Assay des markierten Ausschnitts aus A; C: SDS-PAGE nach Schägger (2. Dimension, 12 %) der in A markierten Proteinkomplexe, Silberfärbung

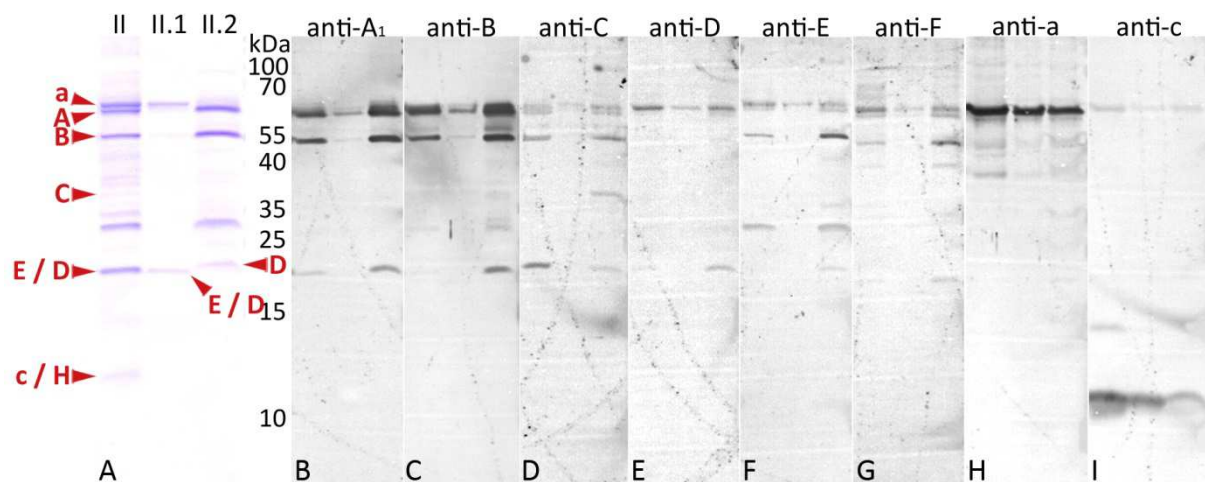
Die Proben der Anionenaustausch- und der Gelfiltrationschromatographien wurden zusätzlich in einer SDS-PAGE nach Schägger aufgetrennt. Das Bandenmuster der Proben I, I.2

und II.2 (Abb. 3.12 A und Abb. 3.13 A) ähnelte stark dem des 440 kDa-Komplexes, während II, II.1 und I.1 ähnliche Banden wie der 669 kDa-Komplex aufwiesen. Um die Untereinheiten der Proteinkomplexe identifizieren zu können, wurden Western Blots mit allen zur Verfügung stehenden Antikörpern gegen Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase durchgeführt. Des Weiteren wurden alle unterscheidbaren Banden von II, sowie einzelne Banden von II.1 und II.2 mittels MALDI-TOF MS/MS analysiert (Abb. 3.13 A). Obwohl in der Fraktion II Hydrogenaseaktivität messbar war, konnten die entsprechenden Untereinheiten in massenspektrometrischen Analysen nicht nachgewiesen werden, so dass diese Verunreinigung als sehr gering eingestuft werden kann.

Alle Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase mit Ausnahme der Untereinheit H konnten in Western Blots detektiert werden. Obwohl in allen Proben Signale auftraten, waren diese unterschiedlich stark ausgeprägt. So dominierten in I.2 und II.2 der A<sub>1</sub>-Subkomplex mit den Untereinheiten A, B und E (Abb. 3.12 B, C und Abb. 3.13 B, C). Auch die Untereinheiten C und D traten hier verstärkt auf (Abb. 3.12 D, E und Abb. 3.13 D, E). Insbesondere die membranständige Untereinheit c war dagegen hauptsächlich in I.1 und II.1 zu finden. Über das Vorkommen der Untereinheit F konnte keine endgültige Aussage getroffen werden, da die Reaktion des entsprechenden Antikörpers mit einer Vielzahl von Banden erfolgte, von denen keine der erwarteten molekularen Masse von ca. 11,0 kDa entsprach (Abb. 3.12 G und Abb. 3.13 G). Die Tatsache, dass einige Signale bei unerwarteten molekularen Massen auftraten, lässt sich durch die Bildung von Komplexen erklären, die nicht vollständig denaturiert wurden. So könnten beispielsweise die Untereinheiten C und D sowie B und F Komplexe von ca. 63 kDa bilden, worauf Signale bei dieser apparenten molekularen Masse im Western Blot hindeuten. Auch die Untereinheiten a und c liegen teilweise als Aggregat vor.



**Abb. 3.12 SDS-PAGE nach Schägger (12 %) der vereinigten Fraktionen HiTrap I, Superdex I.1 und Superdex I.2.** Je 20 µg Protein; A: Coomassie-Färbung; B: Western Blot (WB) mit anti-atp A<sub>1</sub> (*I. hospitalis*, 1:5000); C: WB mit anti-atp B (*M. jannaschii*, 1:1000); D: WB mit anti-atp C (*M. jannaschii*, 1:1000); E: WB mit anti-atp D (*M. jannaschii*, 1:1000); F: WB mit anti-atp E (*M. jannaschii*, 1:1000); G: WB mit anti-atp F (*M. jannaschii*, 1:1000); H: WB mit anti-atp a (rec) (*I. hospitalis*, 1:10000); I: WB mit anti-atp c (syn) (*I. hospitalis*, 1:2500); sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + DyLight 650 (1:2500)



**Abb. 3.13 SDS-PAGE nach Schagger (12 %) der vereinigten Fraktionen HiTrap II, Superdex II.1 und Superdex II.2.** Je 20 µg Protein; A: Coomassie-Färbung; B: Western Blot (WB) mit anti-atp A<sub>1</sub> (*I. hospitalis*, 1:5000); C: WB mit anti-atp B (*M. jannaschii*, 1:1000); D: WB mit anti-atp C (*M. jannaschii*, 1:1000); E: WB mit anti-atp D (*M. jannaschii*, 1:1000); F: WB mit anti-atp E (*M. jannaschii*, 1:1000); G: WB mit anti-atp F (*M. jannaschii*, 1:1000); H: WB mit anti-atp a (rec) (*I. hospitalis*, 1:10000); I: WB mit anti-atp c (syn) (*I. hospitalis*, 1:250); sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + DyLight 650 (1:2500); rot gekennzeichnet sind die durch Peptidmassen-Fingerabdruck identifizierten Untereinheiten

Im Coomassie-gefärbten Gel war lediglich bei HiTrap II eine schwache Bande von geringer apparenter molekularer Masse zwischen 10 und 15 kDa zu erkennen, die mit einem spezifischen Antikörper gegen die Untereinheit c reagierte. Aus dieser Spur wurden alle unterscheidbaren Banden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und mittels MALDI-TOF MS/MS untersucht. Auf diese Weise wurden alle Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase mit Ausnahme der Untereinheit F identifiziert (Abb. 3.13 A; Anhang E).

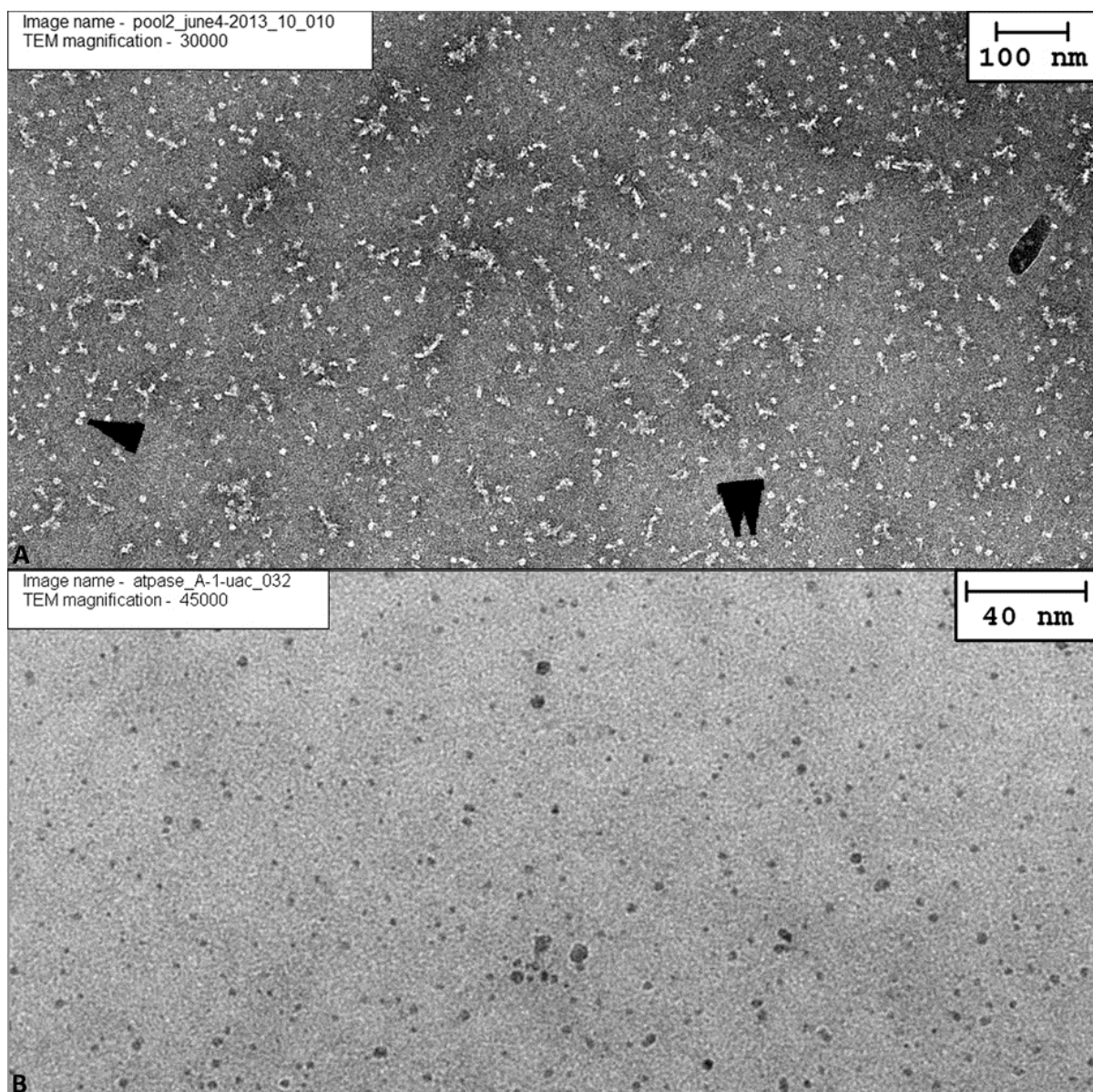
Dass die im Western Blot identifizierten Banden nicht immer mit den Daten aus der Analyse mittels MALDI-TOF MS/MS übereinstimmen, liegt möglicherweise an unspezifischen Reaktionen der Antikörper gegen die Untereinheiten B bis F. Diese sind gegen Proteine aus *M. jannaschii* gerichtet und weisen deshalb eine geringere Spezifität auf als die Antikörper gegen Untereinheiten aus *I. hospitalis*. In Küper, 2010 wurde dies bereits beobachtet und dokumentiert.

Verschiedene Proben der Reinigung, in denen die gekoppelte ATP-Synthase/ATPase vermutet wurde, wurden nach Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure bzw. Uranylacetat elektronenmikroskopisch durch Prof. Dr. Reinhard Rachel bzw. Dr. Janet Vonck analysiert.

In der Probe HiTrap II waren nach Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure zum Teil gut kontrastierte Partikel mit regelmäßiger Struktur und einer Größe von ca. 10 nm zu erkennen, die den A<sub>1</sub>-Teil der ATP-Synthase/ATPase darstellen könnten (Abb. 3.14 A, Doppelpfeil). Vereinzelt waren auch Strukturen erkennbar, die an die ‚Hantelform‘ bzw. ‚knob-stalk-knob‘-Struktur einer gekoppelten ATP-Synthase/ATPase erinnerten (Abb. 3.14 A, Einfachpfeil). Hierbei könnte es sich jedoch auch um zwei zufällig nebeneinander liegende

A<sub>1</sub>-Subkomplexe handeln. Darüber hinaus waren auch viele andere, heterogene Partikel vorhanden, die eine eindeutige Zuordnung erschwerten. Die Heterogenität der Probe deutet auf Verunreinigungen durch Proteine hin, die ohne weitere (chromatographische) Reinigungsschritte kaum zu entfernen sind.

Im Vergleich dazu waren in der mit Uranylacetat kontrastierten Probe lediglich unterschiedlich große, dunkel gefärbte Partikel zu sehen (Abb. 3.14 B). In zukünftigen Präparationen für TEM-Untersuchungen sollte darauf geachtet werden, Kontrastierungsmittel mit neutralem oder leicht alkalischem pH-Wert wie Phosphorwolframsäure oder Ammoniummolybdat einzusetzen. Uranylacetat, dessen pH-Wert im Sauren liegt, wirkt sich offenbar stark negativ auf die Probe aus, so dass keinerlei Partikel oder Strukturen mehr erkennbar sind.



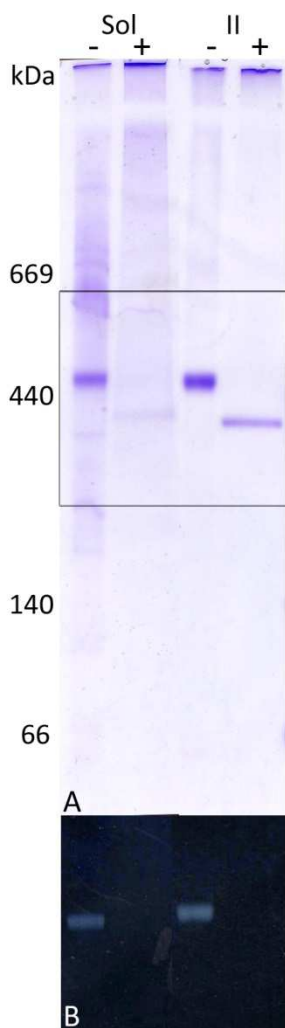
**Abb. 3.14 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Probe HiTrap II.** A: Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure; B: Negativkontrastierung mit Uranylacetat; schwarze Markierungen: mögliche ATP-Synthase/ATPase-Komplexe bzw. Subkomplexe; Aufnahme durch R. Rachel



### 3.2.2.3 Versuche zur Stabilisierung des Gesamtkomplexes

Um einem Zerfall der ATP-Synthase/ATPase in ihre Subkomplexe vorzubeugen, wurden Experimente mit verschiedenen chemischen Fixierungsmitteln durchgeführt.

Zunächst wurde eine Probe der vereinigten Fraktionen nach der Anionenaustauschchromatographie, die bei 16 mS/cm eluierten (HiTrap II) und vermutlich den Gesamtkomplex enthielten, wie beschrieben mit Glutaraldehyd vernetzt (Kap. 2.11.1).



**Abb. 3.15 CNE (5 – 13 %) der vernetzten (+) und unvernetzten (-) Proben Solubilisat (Sol) und HiTrap II (II). Je 30 µl Probenvolumen;**  
A: Coomassie-Färbung;  
B: ATPase In-Gel-Assay des Ausschnitts aus A

Zum Vergleich wurde eine Probe des Solubilisats identisch behandelt. Nach Abstoppen der Crosslink-Reaktion wurden die vernetzten Proben in einem Nativgel mit den unbehandelten Proben verglichen. In den unvernetzten Proben war im Coomassie-gefärbten Gel die bereits beschriebene Bande mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 440 kDa zu sehen (Abb. 3.15 A), die im ATPase In-Gel-Assay aktiv war (Abb. 3.15 B). Darüber hinaus trat im Solubilisat ein Schmier bei etwa 669 kDa auf. In den vernetzten Proben war jeweils eine Bande bei etwas unter 440 kDa sichtbar, welche jedoch keine ATPase-Aktivität zeigte. Zudem schien hier ein Großteil des Proteins nicht in das Gel eingewandert zu sein.

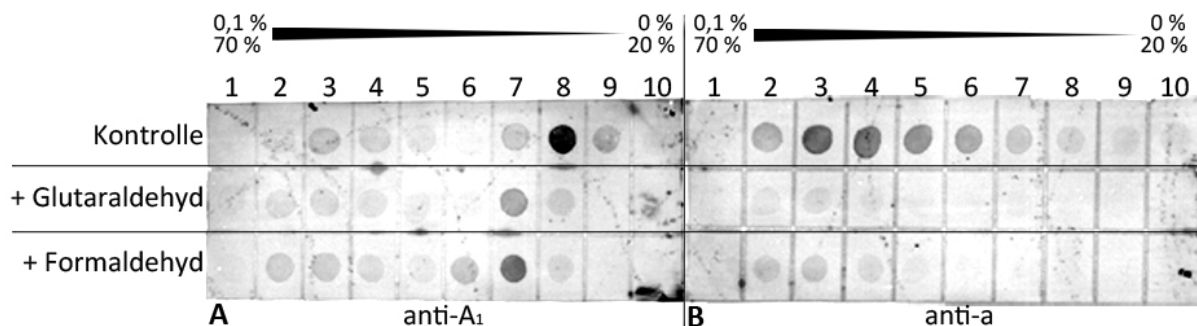
Für eine SDS-PAGE wurden die Proben für 25 Minuten bei 95°C denaturiert. In den Spuren der mit Glutaraldehyd versetzten Proben war lediglich Protein in den Geltaschen bzw. am Übergang von Sammel- und Trenngel zu sehen, während die unbehandelten Proben das erwartete Bandenmuster aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

In weiteren Crosslink-Experimenten wurde mit der sog. GraFix-Methode gearbeitet (Kap. 2.11.2). Zunächst wurden Gradienten mit 10 – 30 % (w/v) sowie 50 – 80 % (w/v) Saccharose hergestellt, die jeweils 0 – 0,1 % (v/v) Glutaraldehyd enthielten. Als Probe dienten die vereinigten Fraktionen HiTrap II aus der Anionenaustauschchromatographie, in der alle Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase vorhanden waren. Ein Dotblot der einzelnen Fraktionen der Gradienten zeigte, dass sich die ATP-Synthase/ATPase im Gradient von 10 – 30 % (w/v) ganz unten in einem Pellet und im Gradient von 50 – 80 % (w/v) ganz oben befand (Daten nicht gezeigt). Um ein vollständiges Durchwandern des Gradienten zu verhindern und gleichzeitig ein Einwandern zu gewährleisten, wurde

für weitere Experimente eine Saccharosekonzentration von 20 – 70 % (w/v) gewählt.

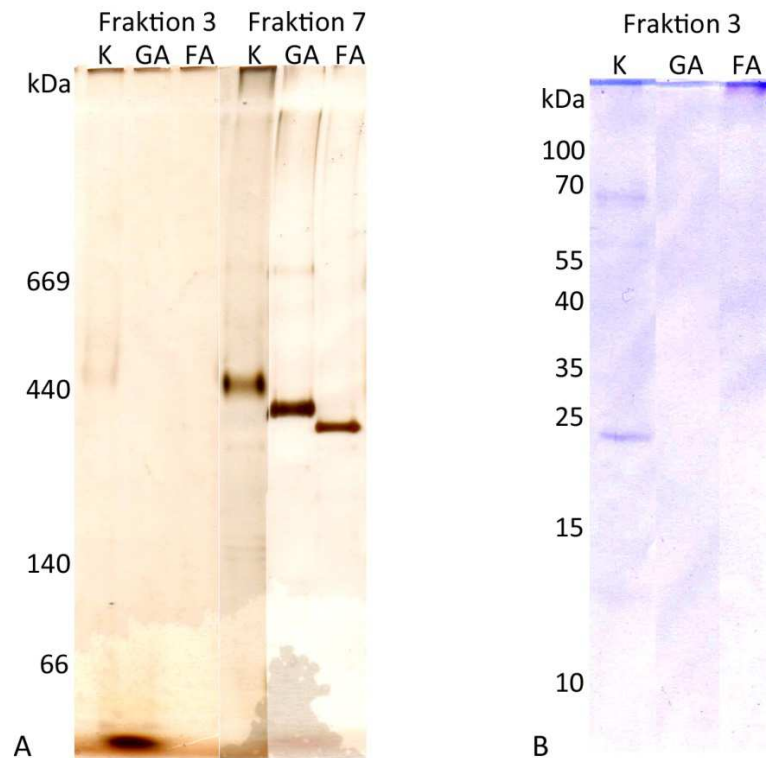
Die Probe HiTrap II wurde demnach auf drei Gradienten von 20 – 70 % (w/v) Saccharose aufgetragen, von denen einer 0 – 0,1 % (v/v) Glutaraldehyd, ein weiterer 0 – 0,1 % (v/v)

Formaldehyd und der dritte kein Fixierungsmittel enthielt. Nach erfolgter Ultrazentrifugation wurden die Gradienten von unten nach oben fraktioniert und die einzelnen Fraktionen auf das Vorhandensein von Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase getestet. Im Dotblot zeigten sich schwache Reaktionen mit dem Antikörper gegen den A<sub>1</sub>-Subkomplex in den Fraktionen 2 – 4 sowie stärkere Signale in den Fraktionen 7 und 8 (Abb. 3.16 A). Der Antikörper gegen die Untereinheit a reagierte hauptsächlich in den Fraktionen 2 – 4 (Abb. 3.16 B). Insgesamt fiel auf, dass die Signale in der Kontrolle stärker ausgeprägt waren als in den vernetzten Proben, was vermutlich auf einen schlechteren Zugang zu den Epitopen aufgrund der Crosslinker zurückzuführen ist.



**Abb. 3.16 Dotblot der Fraktionen der GraFix-Gradienten.** A: anti-atp A<sub>1</sub> (*I. hospitalis*, 1:5000); B: anti-atp a (rec) (*I. hospitalis*, 1:25000); sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + DyLight 650 (1:2500)

Da in den Fraktionen 2 – 4 sowohl der A<sub>1</sub>-Subkomplex als auch die Untereinheit a vorhanden waren, wurde Fraktion 3 in einem Nativ- und SDS-Gel analysiert. Zum Vergleich wurde auch Fraktion 7 aufgetragen, in der im Dotblot gute Signale mit dem Antikörper gegen den A<sub>1</sub>-Subkomplex zu sehen waren. Hier war im Nativgel eine Bande sichtbar, die sich bei der Kontrolle bei etwa 440 kDa befand. Bei der Probe mit Glutaraldehyd zeigte sich die Bande bei etwas geringerer apparenter molekularer Masse und bei der Probe mit Formaldehyd wiederum etwas darunter (Abb. 3.17 A). Hierbei handelt es sich um den A<sub>1</sub>-Subkomplex, der vermutlich durch die beiden Crosslinker in einen kompakteren Zustand versetzt wurde und deshalb eine geringere apparente molekulare Masse aufwies. In Fraktion 3 dagegen war kaum Protein zu detektieren. Bei der Kontrolle war im Nativgel eine schwache Bande bei ca. 440 kDa zu erkennen, während bei der Probe mit Glutaraldehyd ein stark angefärbter Bereich am Ende des Gels zu sehen war. Im SDS-Gel waren lediglich bei der Kontrolle schwache Banden bei ca. 70 kDa, ca. 55 kDa und ca. 25 kDa zu erkennen. Bei der Probe mit Formaldehyd war hauptsächlich Protein angefärbt, welches, wohl aufgrund des hohen Vernetzungsgrades, nicht in das Trenngel eingelaufen war (Abb. 3.17 B).



**Abb. 3.17 CNE und SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der GraFix-Gradienten.** A: CNE (5 – 13 %) der Fraktionen 3 und 7, Silberfärbung; je 100 µl Probenvolumen; B: SDS-PAGE nach Schagger (12 %) der Fraktion 3, Coomassie-Färbung; je 100 µl Probenvolumen

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Fraktion 3 aus dem Formaldehydgradienten war eine Vielzahl an unterschiedlichen Partikeln zu sehen, von denen jedoch keine die Größe oder Beschaffenheit einer ATP-Synthase/ATPase aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise enthielt die Probe Kontaminanten, die mit der ATP-Synthase/ATPase vernetzt wurden und somit keine definierte Struktur mehr erkennen ließen.

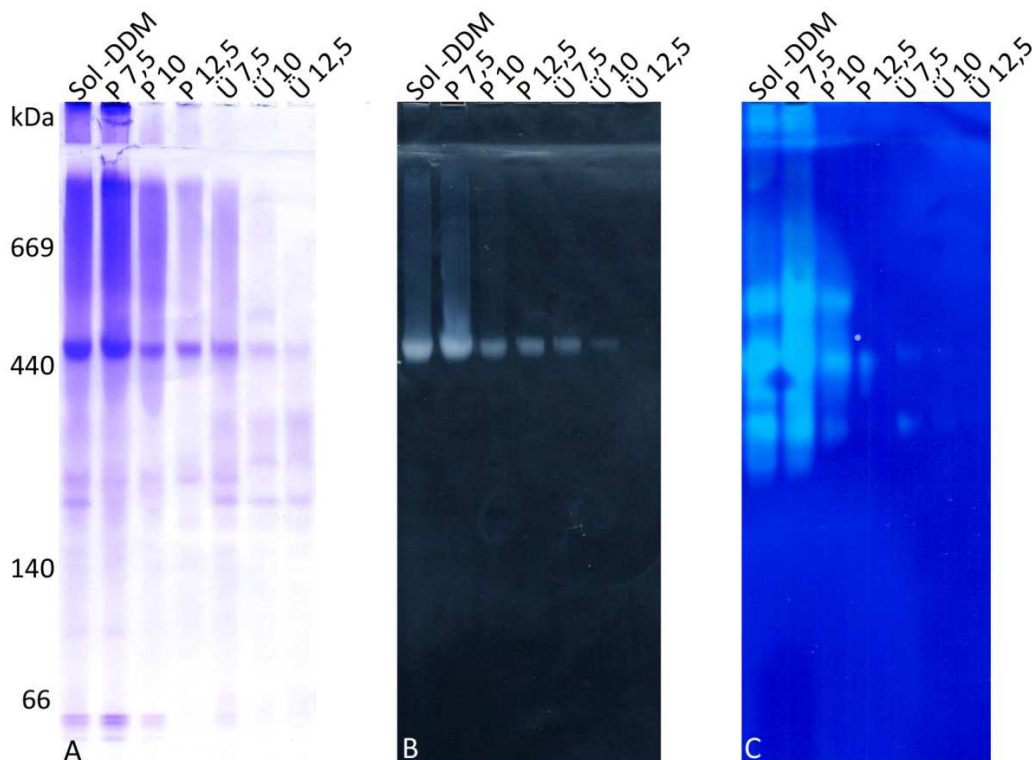
### 3.2.3 Reinigung durch Fällung mit PEG 6000

Als Alternative zur chromatographischen Reinigung der ATP-Synthase/ATPase wurde die Reinigung durch Fällung mit PEG getestet. Hierbei konnten Interaktionen mit Säulenmaterial oder ähnliche, die Stabilität des Enzyms beeinträchtigende Einflüsse ausgeschlossen werden.

#### 3.2.3.1 Reinigung aus bei 90°C gezüchteten Zellen

Regulär bei 90°C gezüchtete Zellen wurden mittels French Press aufgeschlossen und, wie beschrieben, die Membranen präpariert und solubilisiert (Kap. 2.7). Nach mehreren Vorversuchen zur Ermittlung der geeigneten PEG-Konzentration wurde die Fällung mit 7,5 %,

10 % und 12,5 % PEG 6000 durchgeführt (Kap. 2.10.2). Hierbei wurde jeweils im Überstand (Ü, nach Zentrifugation) der vorherigen Fällung die PEG-Konzentration entsprechend erhöht. Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen in einem Nativgel analysiert (Abb. 3.18). Das Solubilisat ohne DDM (Sol -DDM) diente dabei als Referenz. Im Coomassie-gefärbten Gel (Abb. 3.18 A) war zu erkennen, dass im ersten Fällungsschritt (P7,5) bereits sehr viel Protein präzipitiert war. Es waren Banden bei ca. 66 kDa, eine markante Bande bei ca. 440 kDa sowie ein Schmier bei größerer apparenter molekularer Masse zu sehen. In den weiteren Fällungsschritten (P10 und P12,5) war ein ähnliches Bandenmuster sichtbar, jedoch war hier jeweils weniger Protein enthalten. Die Bande mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 440 kDa zeigte Aktivität im ATPase In-Gel-Assay (Abb. 3.18 B) und im Hydrogenase In-Gel-Assay (Abb. 3.18 C). Die Hydrogenaseaktivität war in Spuren mit viel Protein über einen weiten Bereich verteilt und auch dort zu sehen, wo im Coomassie-gefärbten Gel keine definierten Banden auftraten.



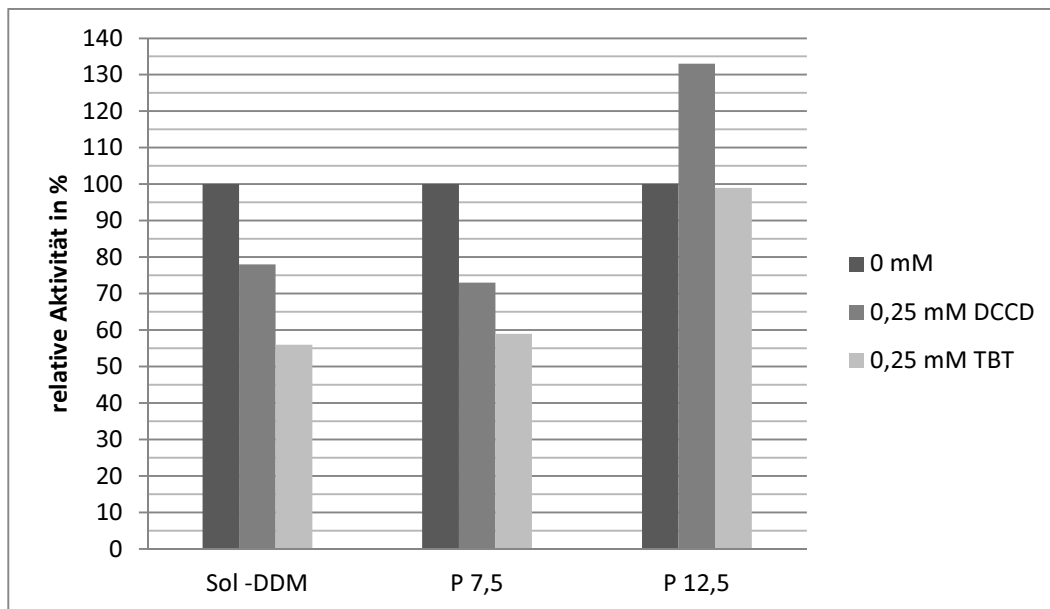
**Abb. 3.18 CNE (5 – 13 %) der Fällungsfractionen aus bei 90°C gezüchteten Zellen.** Je 45 µl Probenvolumen; A: Coomassie-Färbung; B: ATPase In-Gel-Assay; C: Hydrogenase In-Gel-Assay

Das Solubilisat ohne DDM sowie die zwei Fällungsfractionen P 7,5 und P 12,5 wurden einem Hemmstofftest unterzogen. Sowohl beim Solubilisat als auch bei der Probe P 7,5 konnte mit DCCD ein Rückgang der Aktivität auf etwa 75 % und mit TBT-Oxid auf ca. 55 % beobachtet werden (Abb. 3.19). Bei der Probe P 12,5 zeigten beide Hemmstoffe keine Wirkung. Somit handelte es sich bei höheren PEG-Konzentrationen (um 12,5 %) um den dissoziierten A<sub>1</sub>-Subkomplex, während die gekoppelte ATP-Synthase/ATPase bei etwa 7,5 % PEG gefällt



wurde. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass große Proteine die Tendenz haben, bei geringeren PEG-Konzentrationen zu präzipitieren (Juckes, 1971).

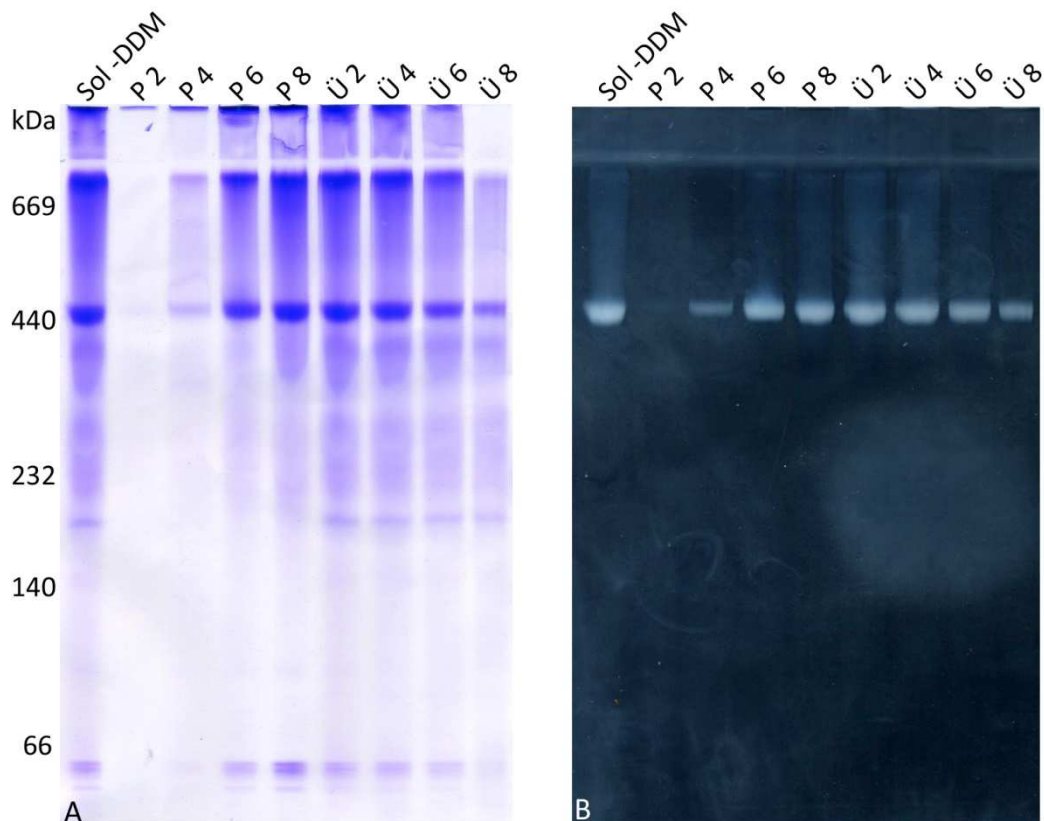
Im Nativgel war dennoch die typische Bande bei 440 kDa zu sehen (Abb. 3.18 A, P 7,5). Demnach zerfällt die ATP-Synthase/ATPase also während der Elektrophorese in ihre Subkomplexe, obwohl die CNE als die mildeste der bekannten Elektrophoresetechniken gilt (Chung et al., 2008). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die beiden Subkomplexe unterschiedlich schnell im Gel wandern. Der lösliche  $A_1$ -Subkomplex wandert mit erwarteter Geschwindigkeit zur Anode, weshalb er auch im Gel bei ca. 440 kDa gefunden wird. Der  $A_0$ -Subkomplex dagegen ist stark hydrophob und wandert deutlich langsamer, was durch die Tatsache bestätigt wird, dass er je nach Dauer der Gelelektrophorese bei unterschiedlichen molekularen Massen detektiert wurde (Küper, 2010). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse muss man also davon ausgehen, dass die Verbindung zwischen  $A_1$ - und  $A_0$ -Teil sehr fragil ist.



**Abb. 3.19** Relative Aktivitäten des Solubilisats (Sol -DDM) sowie der bei 7,5 % (P 7,5) bzw. 12,5 % (P 12,5) gefällten Proteine in Anwesenheit der Hemmstoffe DCCD und TBT-Oxid

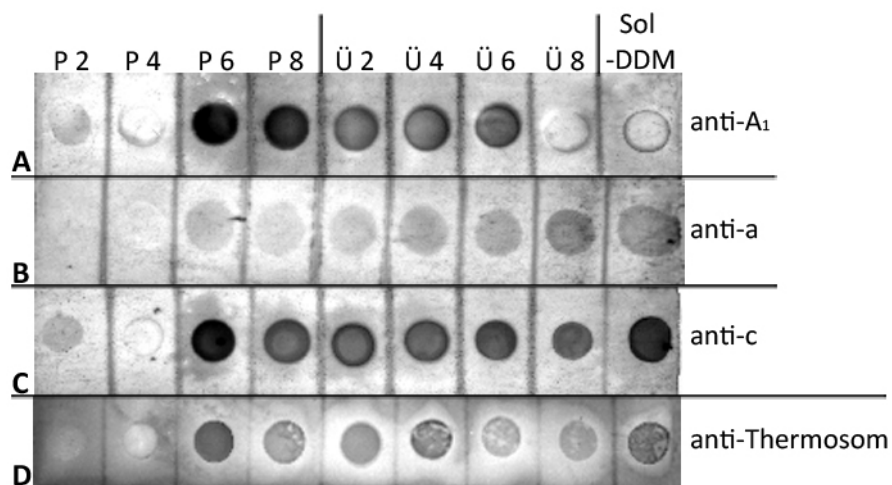
Da den Ergebnissen des Hemmstofftests zufolge nach einer Fällung mit 7,5 % PEG 6000 die ATP-Synthase/ATPase noch gekoppelt vorlag, wurde das Fällungsprotokoll dahingehend optimiert. Ausgehend von der gleichen Probe, wurde zunächst mit 2 % PEG gefällt und dann die PEG-Konzentration schrittweise um jeweils zwei Prozentpunkte auf bis zu 8 % erhöht.

In einem Nativgel wurde ersichtlich, dass bei 2 bzw. 4 % PEG nur sehr wenig Protein gefällt wurde (Abb. 3.20 A). Das Bandenmuster von 6 bzw. 8 % ähnelte sich stark. Hier waren jeweils Banden bei etwa 66 kDa, eine ausgeprägte Bande bei ca. 440 kDa mit ATP-Hydrolyseaktivität (Abb. 3.20 B) sowie ein Proteinschmier bei etwa 669 kDa zu sehen. Im Überstand mit 8 % PEG (Ü 8) war vergleichsweise wenig Protein vorhanden, so dass man davon ausgehen kann, dass hier bereits ein Großteil des Gesamtproteins gefällt wurde.



**Abb. 3.20 CNE (5 – 13 %) der optimierten Fällungsfractionen aus bei 90°C gezüchteten Zellen.** Je 54 µl Probenvolumen; A: Coomassie-Färbung; B: ATPase In-Gel-Assay

Der Dot blot zeigte, dass die Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase vor allem in den Proteinpellets nach Fällung mit 6 bzw. 8 % vertreten waren (Abb. 3.21 A, B, C). Allerdings reagierte auch der Antikörper gegen das Thermosom in diesen Fraktionen am stärksten (Abb. 3.21 D). Darüber hinaus besaßen alle Fällungsfractionen in einem qualitativen Test Hydrogenaseaktivität (Daten nicht gezeigt).

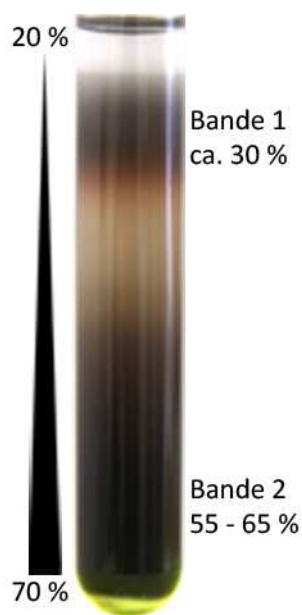


**Abb. 3.21 Dot blot der Fällungsfractionen (P 2 – 8 und Ü 2 – 8) sowie des Solubilisats (Sol -DDM) als Kontrolle.** A: anti-atp A<sub>1</sub> (*I. hospitalis*, 1:5000); B: anti-atp a (rec) (*I. hospitalis*, 1:25000); C: anti-c (syn) (*I. hospitalis*, 1:500); D: anti-Thermosom (*I. hospitalis*, 1:5000); sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + DyLight 650 (1:2500)

### 3.2.3.2 Reinigung aus bei 75°C gezüchteten Zellen

Um den Anteil des Thermosoms am Gesamtprotein zu verringern, wurde *I. hospitalis* bei 75°C statt bei 90°C gezüchtet. Anschließend wurden Zellaufschluss, Membranpräparation und Fällung wie beschrieben durchgeführt.

Bereits das Zellpellet der bei 75°C gezüchteten *I. hospitalis*-Zellen wies eine deutliche Schwarzfärbung auf, die auch im Saccharosegradienten sichtbar war (Abb. 3.22). Nach

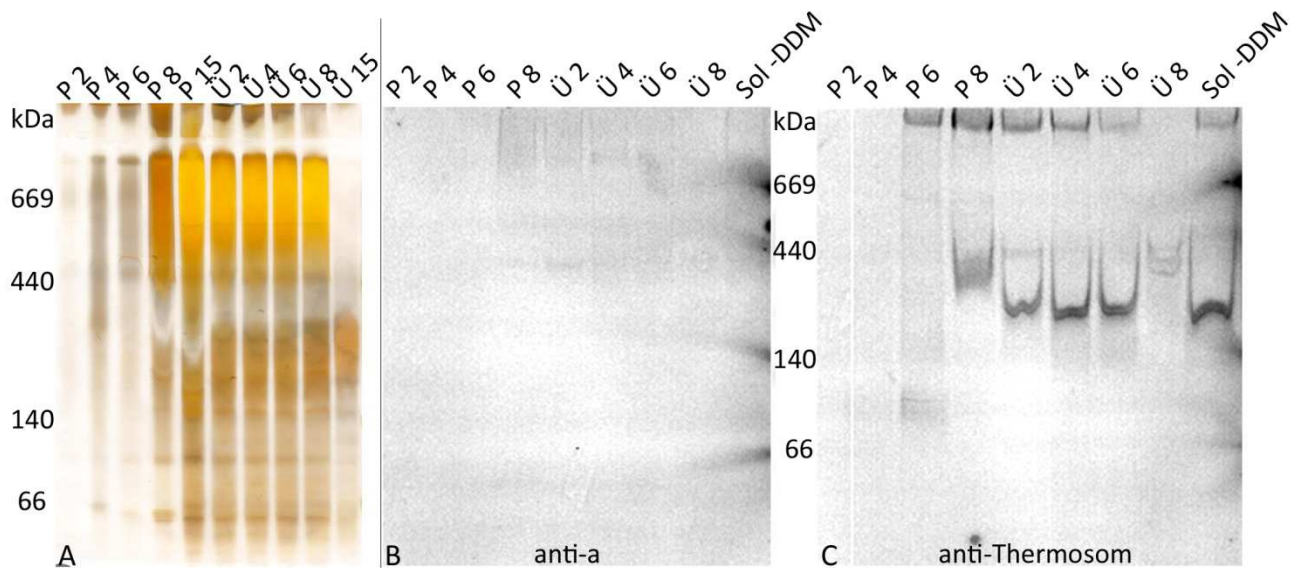


erfolgter Ultrazentrifugation konnten zwei Banden identifiziert werden. Eine dunkelbraun bis schwarz gefärbte Bande befand sich bei etwa 30 % Saccharose (Bande 1) und eine schwarze, trübe Bande erstreckte sich über einen weiten Bereich von 55 – 65 % Saccharose (Bande 2). Letztere wurde für die Solubilisierung eingesetzt. Die schlechte Abgrenzung der Banden deutet auf eine Überladung des Gradienten hin. Darüber hinaus war ein Pellet vorhanden, dessen Bodenschicht durch Schwefelreste hellgelb und die darüber liegende Schicht durch nicht aufgeschlossene Zellen schwarz gefärbt war. Die starke Schwarzfärbung könnte durch Eisen- oder andere Metallsulfide verursacht werden, die aus dem von *I. hospitalis* gebildeten  $H_2S$  entstehen, sich auf den Membranen niederschlagen und die normalerweise durch Cytochrome rötliche Farbe überdecken.

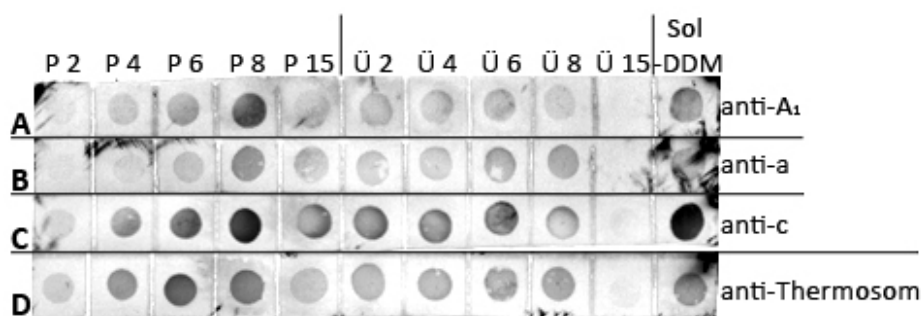
**Abb. 3.22** Saccharose-Dichtegradient (20 – 70 %) von bei 75°C gezüchteten Zellen

Das Solubilisat wurde vorbereitend für die Fällung wie beschrieben (Kap. 2.10.1) aufkonzentriert und mit DDM-freiem Lysepuffer verdünnt, um so eine weitgehend DDM-freie Probe zu erhalten. Die Fällung erfolgte zunächst mit 2 % PEG. Anschließend wurde die PEG-Konzentration schrittweise um jeweils zwei Prozentpunkte auf bis zu 8 % und abschließend auf 15 % erhöht.

Die Fällungsfractionen wurden einer nativen Gelelektrophorese unterzogen. Im Silbergefärbten Gel (Abb. 3.23 A) unterschied sich das Bandenmuster kaum von dem von bei 90°C gezüchteten Zellen (Abb. 3.20 A). Ein Dotblot zeigte, dass in den Fraktionen nach Fällung mit 6 bzw. 8 % PEG sowohl die ATP-Synthase/ATPase als auch in signifikanter Menge das Thermosom vorhanden war (Abb. 3.24). Dies wurde durch einen Western Blot eines Nativgels bestätigt. Der Antikörper gegen die Untereinheit a zeigte vor allem in den Spuren von P8 und Ü2 eine Reaktion mit dem Proteinschmier bei ca. 669 kDa, wobei die Signale insgesamt sehr schwach waren (Abb. 3.23 B). Mit dem Antikörper gegen das Thermosom konnte zum einen eine Bande von sehr großer apparenter molekularer Masse (weit über 669 kDa) und zum anderen eine Bande zwischen 140 und 440 kDa identifiziert werden (Abb. 3.23 C).



**Abb. 3.23 CNE (5 – 13 %) mit Western Blots der Fällungsfractionen aus bei 75°C gezüchteten Zellen.** Je 36 µl Probenvolumen; A: Silberfärbung; B: anti-atp a (rec) (*I. hospitalis*, 1:25000); C: anti-Thermosom (*I. hospitalis*, 1:5000); sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + DyLight 650 (1:2500)



**Abb. 3.24 Dotblot der Fällungsfractionen (P 2 – 15 und Ü 2 – 15) sowie des Solubilisats (Sol -DDM) als Kontrolle.** A: anti-atp A<sub>1</sub> (*I. hospitalis*, 1:5000); B: anti-atp a (rec) (*I. hospitalis*, 1:25000); C: anti-c (syn) (*I. hospitalis*, 1:500); D: anti-Thermosom (*I. hospitalis*, 1:5000); sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + DyLight 650 (1:2500)

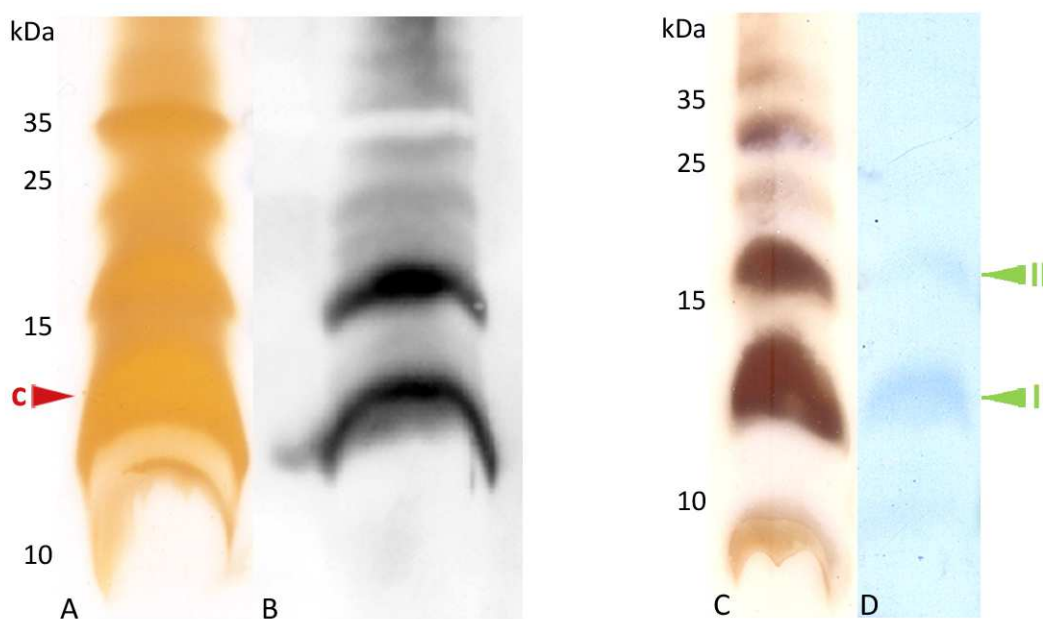
Da in der Fraktion nach Fällung mit 8 % PEG sowohl membranständige als auch lösliche Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase nachgewiesen worden waren, wurde diese Probe trotz vorhandener Verunreinigungen durch andere Proteine in verschiedenen Konzentrationen für elektronenmikroskopische Untersuchungen präpariert und mit Phosphorwolframsäure negativkontrastiert. Im Elektronenmikroskop waren Partikel unterschiedlicher Größe zu sehen (< 10 bis > 30 nm), die zum Teil sehr dicht gelagert waren (Daten nicht gezeigt). Typische ‚hantelförmige‘ Strukturen, die auf eine gekoppelte ATP-Synthase hindeuten würden, waren dadurch nicht zu erkennen. Bei den beobachteten Partikeln könnte es sich um unterschiedliche Membranproteine handeln, die aufgrund ihrer Hydrophobizität aggregieren. Es wäre jedoch auch denkbar, dass solche Aggregate aus jeweils mehreren ATP-Synthasen/ATPasen bestehen. Immunmarkierungen deuten darauf hin, dass die ATP-Synthase/ATPase in der OCM Cluster bildet (Küper, 2010), so dass die beobachteten Aggregate möglicherweise keine Artefakte der Probenpräparation sind.

### 3.3 Isolierung und Charakterisierung der Untereinheit c der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis*

*I. hospitalis*-Zellen wurden in ‚FfM‘ Lysepuffer aufgeschlossen und wie beschrieben mittels differentieller Zentrifugation die Membranen präpariert (Kap. 2.6.1). Kleine, hydrophobe Membranproteine wurden mit Chloroform/Methanol aus den Membranen extrahiert (Kap. 2.8). Nach Fällung der extrahierten Proteine wurden sie in eine wässrige Phase überführt und mittels Western Blot, MALDI-TOF MS/MS und N-terminaler Sequenzierung untersucht. Darüber hinaus wurde die Untereinheit c bioinformatisch analysiert.

#### 3.3.1 Biochemische Analyse

In Silber-gefärbten Gelen der Chloroform/Methanol-Extrakte (Abb. 3.25 A, C) war eine Vielzahl an Banden von geringer apparenter molekularer Masse (ca. 10 bis 35 kDa) zu sehen.



**Abb. 3.25 SDS-PAGE nach Schägger (15 %) der Chloroform/Methanol-Extrakte von *I. hospitalis*.** A: Silberfärbung; rot gekennzeichnet ist die durch Peptidmassen-Fingerabdruck identifizierte Untereinheit c; B: Western Blot mit anti-atp c (syn) (*I. hospitalis*, 1:500), sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + HR Peroxidase (1:5000); C: Silberfärbung; D: Coomassie-gefärbte Membran nach Transfer; grün gekennzeichnet sind die Banden, die für N-terminale Sequenzierung herangezogen wurden

Zwei dieser Banden reagierten stark mit dem Antikörper gegen die c-Untereinheit von *I. hospitalis* (Abb. 3.25 B). Eine dritte Bande bei etwa 35 kDa erschien im Western Blot weiß, was auf eine Überbelichtung durch ein sehr starkes Signal hindeutet. Vermutlich handelt sich hier um ein Mono-, Di- und Trimer desselben Proteins. Die unterste Bande zwischen 10 und

15 kDa wurde nach Verdau mit Chymotrypsin zusätzlich durch MALDI-TOF MS/MS als Untereinheit c identifiziert.

Auf einer Coomassie-gefärbten PVDF-Membran waren zwei Banden sichtbar (Abb. 3.25 D), welche für die N-terminale Sequenzierung herangezogen wurden. Beide Proteine hatten die gleiche N-terminale Aminosäuresequenz wie das Protein Igni\_0682 ab der 32. Aminosäure (AS) (Tab. 3.3). Obwohl bei Bande II nicht alle Aminosäuren bestimmt werden konnten, wurden die Ergebnisse des Western Blots bestätigt, dass es sich bei den untersuchten Banden um die c-Untereinheit sowie vermutlich deren Dimer handelt.

	N-terminale Aminosäuresequenz							
Bande I	A	E	M	G	E	T	S	L
Bande II	A	E	-	-	E	T	-	-
Igni_0682 (ab AS 32)	A	E	M	G	E	T	S	L

**Tab. 3.3 N-terminale Aminosäuresequenzen der in Abb. 3.25 D markierten Banden aus *I. hospitalis* sowie der Untereinheit c (Igni\_0682).** Blau sind AS, die nicht eindeutig identifiziert werden konnten

### 3.3.2 Bioinformatische Analyse

Das Protein Igni\_0682 ist annotiert als ‚H<sup>+</sup>-transporting two-sector ATPase, C subunit‘ (NCBI) mit einer Länge von 113 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 11,2 kDa (siehe unten). Für dieses Protein werden mit Programmen zur reinen Vorhersage von Transmembranhelices wie TMHMM oder TMPred drei Transmembranhelices vorhergesagt. Programme wie SOSUIsignal oder Phobius dagegen sagen zwei Transmembranhelices und ein Signalpeptid von 31 Aminosäuren Länge voraus.

Für das Protein ohne Signalsequenz, beginnend bei AS 32, ergeben sich eine molekulare Masse von 7,98 kDa und zwei Transmembranhelices.

Igni\_0682:

MKAELMPKRAIRSVLLSILFVTLVGASAALA AEMGETSLGTGMMTGLKAVGAGLALLGGTIGAGYALGAT  
GAAGIAVISEKPEEFGRVLLFIGIAETPAIYGIAIAIVILFAI

Gelb hinterlegt ist das Signalpeptid, rot markiert ist die vorhergesagte Ionenbindestelle (Grüber et al., 2014). Demzufolge ist die c-Untereinheit von *I. hospitalis* protonenspezifisch.



### 3.4 Versuche zur Reinigung der ATP-Synthasen/ATPasen von *I. pacificus* und *I. islandicus*

#### 3.4.1 Die ATP-Synthase/ATPase von *I. pacificus*

##### 3.4.1.1 Interpretation der Genomdaten

Das sequenzierte und vorläufig annotierte Genom von *I. pacificus* wurde freundlicherweise von Dr. Mircea Podar vom Oak Ridge National Laboratory (Oak Ridge, USA) zur Verfügung gestellt. Darin fanden sich acht ORFs für Untereinheiten einer  $A_1A_0$  ATP-Synthase/ATPase (Tab. D.2). Ein Gen für die Untereinheit H war weder annotiert noch konnte es durch eine BLAST-Suche mit dem Gen der entsprechenden Untereinheit aus *I. hospitalis* identifiziert werden. Eine Gegenüberstellung der Sequenzidentitäten der einzelnen Untereinheiten findet sich in Tabelle 3.4. Zu bemerken ist, dass die Sequenzidentitäten innerhalb der Gattung *Ignicoccus* im Vergleich zu den beiden mit einbezogenen Organismen *M. jannaschii* und *P. furiosus* sehr hoch sind. Auch die annotierten Molekülmassen der verschiedenen *Ignicoccus*-Arten weichen nicht nennenswert voneinander ab.

Untereinheit	<i>I. pacificus</i>	<i>I. islandicus</i>	<i>M. jannaschii</i>	<i>P. furiosus</i>
A	91 %	89 %	57 %	59 %
B	93 %	92 %	67 %	69 %
C	54 %	51 %	33 %	31 %
D	71 %	70 %	35 %	32 %
E	51 %	46 %	27 %	30 %
F	67 %	70 %	32 %	35 %
H	-	-	-	-
a (I)	69 %	67 %	24 %	23 %
c (K)	76 %	79 %	45 %	34 %

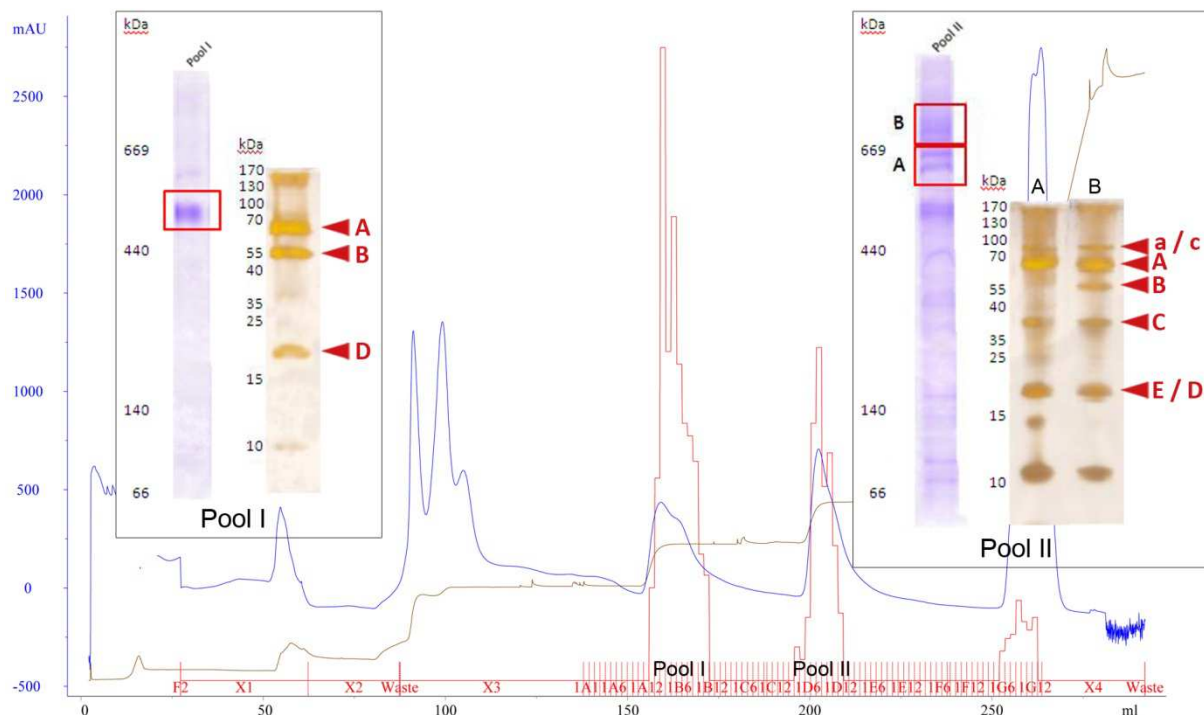
Tab. 3.4 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* mit den entsprechenden Sequenzen verschiedener Organismen. Übereinstimmung angegeben in %

##### 3.4.1.2 Versuche zur Reinigung

In einer begleitenden Zulassungsarbeit bzw. Masterarbeit wurden von Herrn Alexander Ziegler erstmalig Versuche zur Reinigung und Charakterisierung der ATP-Synthase/ATPase von *I. pacificus* durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das Reinigungsprotokoll für die ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* im AMP-SO-Puffersystem bei pH 9,0 übernommen. Dieses wurde jedoch im Laufe der Arbeit angepasst (Ziegler, 2014).

Der Zellaufschluss erfolgte demnach wie beschrieben mittels French Press (Kap. 2.5.2). Die Dichtegradientenzentrifugation wurde mit einem Saccharosegradienten von 50 – 80 % statt 20 – 70 % durchgeführt, da dies zu einer besseren Trennung der Banden führte. Zwei Banden

bei 58 – 65 % und bei 68 – 75 % Saccharose enthielten lichtmikroskopisch sichtbare Partikel und besaßen ATP-Hydrolyseaktivität. In beiden konnte darüber hinaus mit dem entsprechenden Antikörper der A<sub>1</sub>-Subkomplex nachgewiesen werden, weshalb beide zusammen für eine Solubilisierung mit DDM eingesetzt wurden. Bei der anschließenden Anionenaustauschchromatographie über drei in Reihe geschaltete Säulen (HiTrap Q HP) erfolgte die Elution mit Puffern der Leitfähigkeit 9,0 mS/cm, 12,5 mS/cm und 16,7 mS/cm. Auf diese Weise konnten zwei Proteinpeaks, die starke ATP-Hydrolyseaktivität zeigten, gut voneinander getrennt werden (Abb. 3.26). Der erste Peak, Pool I bei 12,5 mS/cm, enthielt einen Proteinkomplex, der im Nativgel eine apparente molekulare Masse zwischen 560 und 612 kDa aufwies und im ATPase In-Gel-Assay aktiv war. Durch eine native Gelelektrophorese in einem linearen Gel konnte die Größe des Komplexes gut abgeschätzt werden. Mittels MALDI-TOF MS/MS wurden nach Verdau mit Trypsin die Untereinheiten A, B und D der ATP-Synthase/ATPase von *I. pacificus* eindeutig identifiziert.



**Abb. 3.26 Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q HP) von *I. pacificus* (nach Ziegler, 2014).** Fraktionsgröße 2 ml. blau (—): UV-Absorption bei 280 nm; braun (—): Leitfähigkeit; rot (—): ATP-Hydrolyseaktivität; eingefügt sind jeweils CNE (Coomassie-gefärbt) und SDS-PAGE (Silber-gefärbt) von Pool I und II; rot markiert sind die Banden aus der CNE, die in der 2. Dimension aufgetrennt wurden sowie die darin identifizierten Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase

Im zweiten Peak, Pool II bei 16,7 mS/cm, konnte im Nativgel ebenfalls eine Bande bei 560 – 612 kDa nachgewiesen werden. Darüber hinaus war eine deutliche Bande bei ca. 669 kDa zu erkennen. Dieser Pool II enthielt die Untereinheiten A, B, E und a (nachgewiesen durch MALDI-TOF MS/MS) sowie die Untereinheiten c, C und D (nachgewiesen durch Western Blot) und somit fast alle Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase, mit Ausnahme von F und H.



Die Ergebnisse der Western Blots mit Antikörpern gegen die Untereinheit F ließen keine eindeutigen Aussagen zu.

Sowohl von Pool I als auch von Pool II wurden Proben für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Jedoch entstanden weder nach Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure noch mit Ammoniummolybdat aussagekräftige Bilder (Daten nicht gezeigt).

Der Unterschied in der apparenten molekularen Masse, den der aktive Komplex von *I. pacificus* in der CNE im Vergleich zum aktiven Komplex von *I. hospitalis* zeigte, belief sich auf ca. 120 kDa. Es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei nicht um ein abnormales Laufverhalten in der Gelelektrophorese handelt. Diese lief für 48 Stunden, was aber die Position des Komplexes im Gel nicht veränderte. Durch bioinformatische Analysen der beteiligten Untereinheiten konnte das Phänomen in Ziegler, 2014 nicht erklärt werden.

Gegen den Proteinkomplex bei 560 – 612 kDa wurden spezifische Antikörper mit dem Ziel hergestellt, diese für Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten von *I. pacificus* einzusetzen. Erste Tests im Western Blot zeigten gute Reaktionen der Antikörper mit Proben von *I. pacificus* im Vergleich zu *I. hospitalis* oder *I. islandicus*. Immunmarkierungen führten jedoch noch nicht zu aussagekräftigen Bildern (mündliche Mitteilung von Jennifer Flechsler).

### **3.4.2 Die ATP-Synthase/ATPase von *I. islandicus***

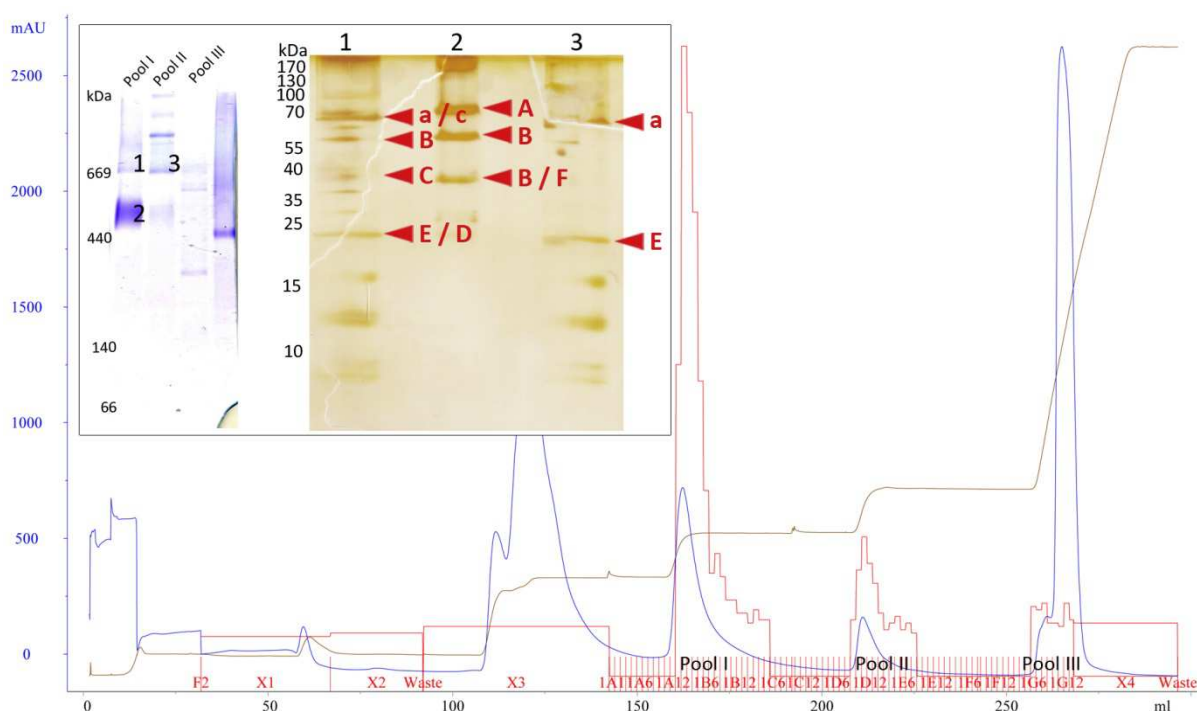
#### **3.4.2.1 Interpretation der Genomdaten**

Das sequenzierte und vorläufig annotierte Genom von *I. islandicus* wurde freundlicherweise von Dr. Mircea Podar vom Oak Ridge National Laboratory (Oak Ridge, USA) zur Verfügung gestellt. Darin fanden sich neun ORFs für Untereinheiten einer  $A_1A_0$  ATP-Synthase/ATPase, die in Tab. D.3 im Anhang aufgelistet sind. Wie bei *I. pacificus* war weder ein Gen für die Untereinheit H annotiert noch konnte es durch eine BLAST-Suche mit dem Gen der entsprechenden Untereinheit aus *I. hospitalis* identifiziert werden. Die Untereinheit a war jedoch doppelt annotiert als lis\_00950 und lis\_01310. Nach einem Vergleich der Molekülmassen sowie einer BLAST-Suche und einem Sequenzalignment mit der Untereinheit a aus *I. hospitalis* konnte lis\_00950 als wahrer Kandidat für die Untereinheit a identifiziert werden. lis\_01310 wurde deshalb nicht in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen. Eine Gegenüberstellung der Sequenzidentitäten der einzelnen Untereinheiten findet sich in Tabelle 3.4. Die Sequenzidentitäten innerhalb der Gattung *Ignicoccus* sind im Vergleich zu den beiden mit einbezogenen Organismen *Methanocaldococcus jannaschii* und *Pyrococcus furiosus* sehr hoch und auch die annotierten Molekülmassen der verschiedenen *Ignicoccus*-Arten weichen nicht nennenswert voneinander ab.

### 3.4.2.2 Versuche zur Reinigung

Analog zur Vorgehensweise bei der Reinigung der ATP-Synthase/ATPase von *I. pacificus* wurden von Frau Julia Weigl in einer begleitenden Bachelorarbeit Versuche zur Reinigung der ATP-Synthase/ATPase von *I. islandicus* im AMPSO-Puffersystem bei pH 9,0 durchgeführt (Weigl, 2013).

Nach einem Zellaufschluss mittels French Press (Kap. 2.5.2) erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation in einem Saccharosegradienten von 50 – 80 %. In zwei Banden bei 58 – 65 % und 67 – 75 % Saccharose konnten lichtmikroskopisch Partikel nachgewiesen werden. Für eine Solubilisierung mit DDM wurde die Bande bei 58 – 65 % Saccharose eingesetzt, da nur in dieser ATP-Hydrolyseaktivität detektiert werden konnte. Bei der Anionenaustauschchromatographie wurde mit Puffern der Leitfähigkeit 9,0 mS/cm, 12,5 mS/cm und 16,0 mS/cm eluiert. Ein Proteinpeak mit starker ATP-Hydrolyseaktivität, Pool I, trat bei 12,5 mS/cm auf. Ein kleinerer Peak mit schwacher Hydrolyseaktivität, Pool II, wurde bei 16,0 mS/cm eluiert und ein weiterer, Pool III, bei der finalen Stoßelution (Abb. 3.27).



**Abb. 3.27 Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q HP) von *I. islandicus* (nach Weigl, 2013).** Fraktionsgröße 2 ml. blau (—): UV-Absorption bei 280 nm; braun (—): Leitfähigkeit; rot (—): ATP-Hydrolyseaktivität; eingefügt sind CNE (Coomassie-gefärbt) und SDS-PAGE (Silber-gefärbt) der Pools I, II und III; rot markiert sind identifizierten Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase

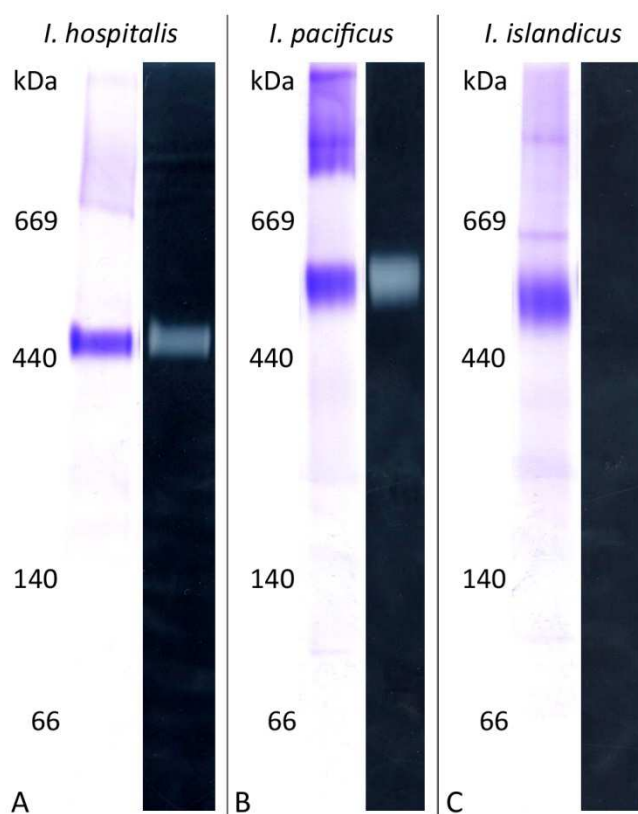
Pool I zeigte im Nativgel eine stark ausgeprägte Bande mit einer apparenten molekularen Masse zwischen 440 und 669 kDa sowie eine breite Bande bei ca. 669 kDa. Nach einer 2D-SDS-PAGE konnten die Untereinheiten A, B, E, F und a nachgewiesen werden. Die Bande

zwischen 440 und 669 kDa zeigte im Western Blot eine gute Reaktion mit Antikörpern gegen den  $A_1$ -Subkomplex. Im ATPase In-Gel-Assay zeigte sie jedoch keine Aktivität. Mittels Western Blot konnten in Pool I zusätzlich die Untereinheiten c, C und D nachgewiesen werden. Somit lagen alle Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase im Pool I vor. In Pool II und III konnten zwar auch einzelne Untereinheiten identifiziert werden, jedoch nicht genug, um ein vollständiges Enzym zu bilden (Weigl, 2013).

Die ATP-Synthase/ATPase von *I. islandicus* verhielt sich anders als erwartet, indem der gekoppelte Komplex früher, d.h. bei geringerer Leitfähigkeit von der Säule eluierte als bei *I. hospitalis* und *I. pacificus*. Da der Unterschied nicht sehr groß ist, lässt sich dieses Phänomen durch unterschiedliche Ladungsverteilungen und damit unterschiedlich starke Bindung an die Matrix der Anionenaustauschersäule erklären.

### 3.4.3 Vergleich der ATP-Synthasen/ATPasen verschiedener *Ignicoccus*-Spezies

Für den direkten Vergleich der ATP hydrolysierenden Proteinkomplexe von *I. hospitalis*,



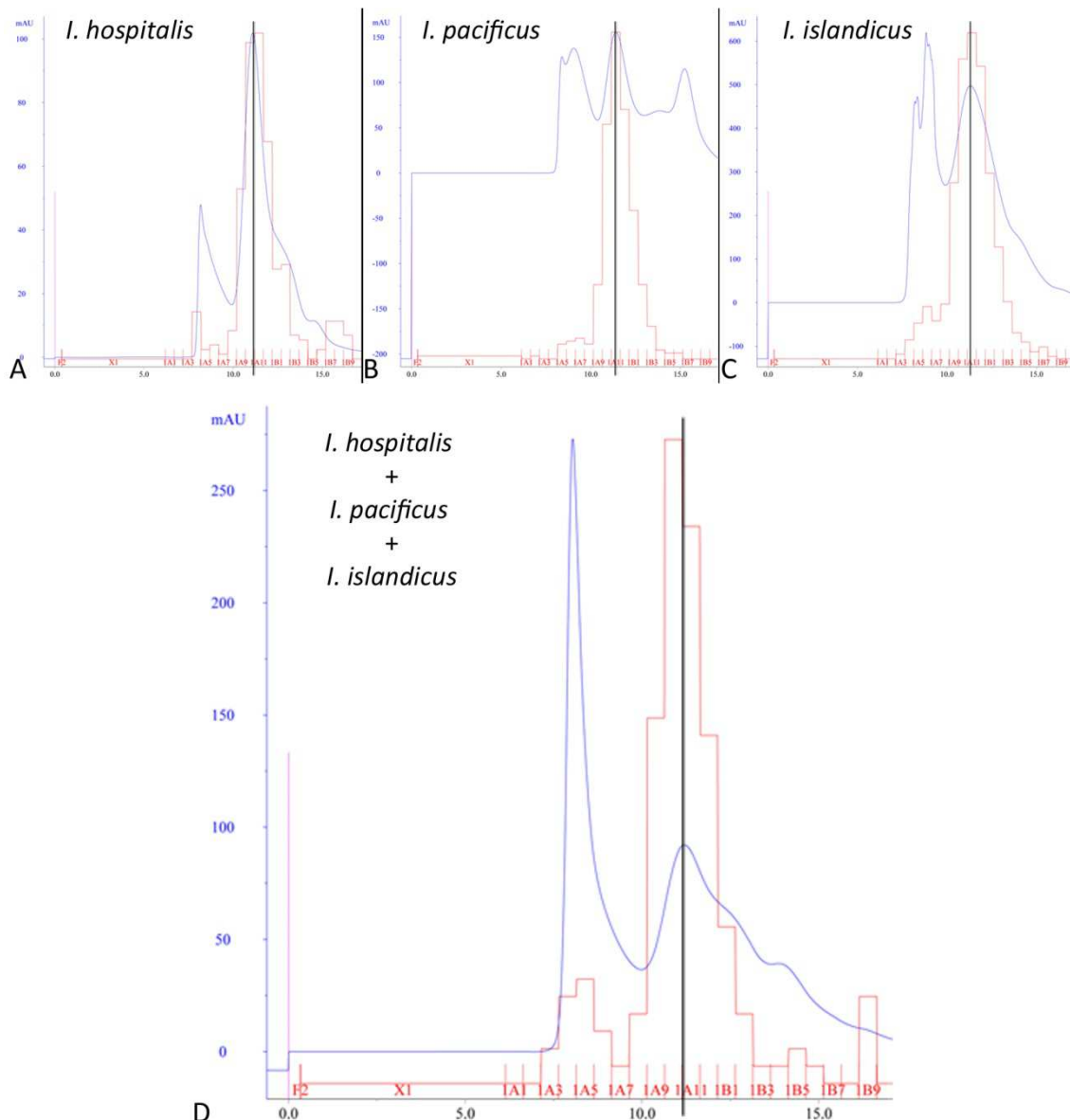
**Abb. 3.28** CNE (5 – 13 %) der jeweils vereinten aktivsten Fraktionen von *I. hospitalis*, *I. pacificus* und *I. islandicus*, die bei 12,5 mS/cm vom Anionenaustauscher eluiert wurden. Je 20 µg Protein; A: *I. hospitalis*, B: *I. pacificus*, C: *I. islandicus*; linke Spur: Coomassie-Färbung; rechte Spur: ATPase In-Gel-Assay

*I. pacificus* und *I. islandicus* wurden die jeweiligen Membranpräparationen solubilisiert und einer Anionenaustauschchromatographie unterzogen. Diese erfolgte über drei in Reihe geschaltete Anionenaustauscher (HiTrap Q HP) mit der gleichen Puffercharge (Leitfähigkeiten 9,0 mS/cm, 12,5 mS/cm und 16,0 mS/cm) und dem identischen Programm. Die jeweils aktivsten Fraktionen, die bei einer Leitfähigkeit von 12,5 mS/cm eluierten, wurden in einem Nativgel analysiert.

Wie bereits zuvor beschrieben, trat bei *I. hospitalis* eine Bande bei ca. 440 kDa auf, die auch im ATPase In-Gel-Assay aktiv war (Abb. 3.28 A). Bei *I. pacificus* und *I. islandicus* dagegen war eine prominente Bande deutlich über 440 kDa zu sehen (Abb. 3.28 B und C). Diese zeigte bei *I. pacificus*

ATP-Hydrolyseaktivität im In-Gel-Assay, während bei *I. islandicus* keine Aktivität festgestellt werden konnte. Die fehlende Aktivität im In-Gel-Assay scheint eine Eigenschaft der ATP-Synthase/ATPase von *I. islandicus* zu sein, die bislang nicht erklärt werden kann. Keiner der Proteinkomplexe zeigte Aktivität im Hydrogenase In-Gel-Assay (Abbildung nicht gezeigt), was die Reinheit der Fraktionen unterstreicht.

Die jeweiligen Fraktionen wurden aufkonzentriert und deren molekulare Masse über eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200) abgeschätzt.



**Abb. 3.29 Chromatogramme der Gelfiltrationschromatographie (Superdex 200) von *I. hospitalis*, *I. pacificus* und *I. islandicus*.** A: HiTrap I von *I. hospitalis*; B: HiTrap I von *I. pacificus*; C: HiTrap I von *I. islandicus*; D: jeweils HiTrap I von *I. hospitalis*, *I. pacificus* und *I. islandicus*. Fraktionsgröße 0,5 ml. Schwarz markiert sind jeweils die Proteinpeaks mit der höchsten ATP-Hydrolyseaktivität. blau (—): UV-Absorption bei 280 nm; rot (—): ATP-Hydrolyseaktivität

Hier traten die Proteinpeaks mit der jeweils höchsten Aktivität immer bei einem Elutionsvolumen von ca. 11 ml auf (Abb. 3.29 A – C, schwarze Markierungen). Auch nach

Mischung der drei Proben zeigte sich ein vergleichbares Bild mit einem definierten, aktiven Proteinpeak bei einem Elutionsvolumen von ca. 11 ml (Abb. 3.29 D), bei dem gemäß den Herstellerangaben auch das Protein Ferritin mit einer Molekülmasse von 440 kDa eluiert. Da es sich bei den A<sub>1</sub>-Subkomplexen ebenfalls um lösliche Proteine handelt, kann man davon ausgehen, dass diese bei gleichem Elutionsvolumen eine ähnliche molekulare Masse von etwa 440 kDa besitzen.

### **3.5 Versuche zur Reinigung und Charakterisierung der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans***

Zur Klärung der Frage, ob *N. equitans* eine funktionsfähige ATP-Synthase/ATPase besitzt, wurden Versuche zur Reinigung und Charakterisierung des Enzyms unternommen. Da reine *N. equitans*-Zellmassen nur in sehr geringer Menge zur Verfügung standen, wurde mit Zellen der Mischkultur von *I. hospitalis* und *N. equitans* (Kin4/M) gearbeitet, von denen bei der Ernte freie *N. equitans*-Zellen abgetrennt worden waren. Alternativ wurden auch Zellen der Mischkultur verwendet, die nicht den Arbeitsschritten zur Abtrennung von *N. equitans*-Zellen unterzogen worden waren, sondern direkt nach der Ernte frisch aufgeschlossen wurden.

#### **3.5.1 Versuche zur Reinigung der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* im Tris-Puffersystem bei pH 8,0**

Erste Versuche zur Isolierung der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* wurden mit Zellen der Mischkultur Kin4/M nach Abtrennung freier *N. equitans*-Zellen und Einfrieren in flüssigem Stickstoff durchgeführt. Sie erfolgten im etablierten Puffersystem basierend auf Tris bei pH 8,0. Als Kontrolle wurden jeweils Präparationen der *I. hospitalis*-Reinkultur herangezogen, die identisch behandelt wurden. Die Zellen wurden in ‚FfM‘ Lysepuffer gelöst und mittels French Press (Kap. 2.5.2) aufgeschlossen.

### 3.5.1.1 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

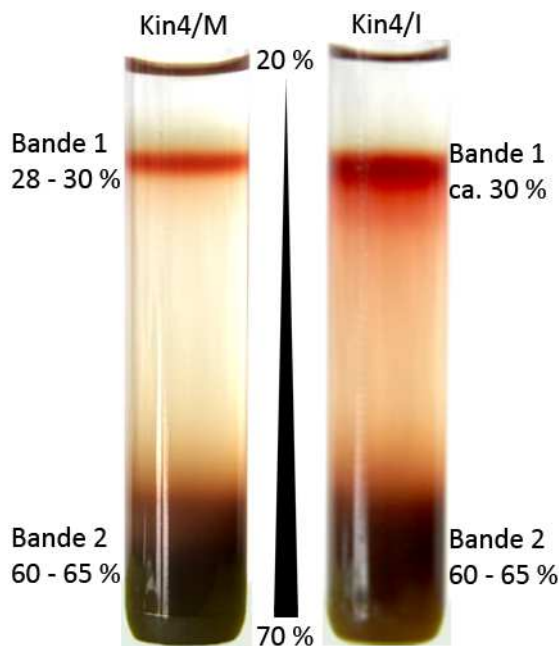


Abb. 3.30 Saccharose-Dichtegradient (20 – 70 %) von Kin4/M (links) und Kin4/I (rechts) bei pH 8,0

Nach erfolgter Dichtegradientenzentrifugation zeigten beide Gradienten ein sehr ähnliches Bild. In beiden war eine klare, rötlich gefärbte Bande bei etwa 30 % Saccharose zu sehen (Abb. 3.30, Bande 1). Des Weiteren trat eine trübe, dunkelbraun gefärbte Bande bei 60 – 65 % Saccharose auf (Abb. 3.30, Bande 2). In beiden Röhrchen gab es zudem ein Pellet, welches zum einen Teil aus dunkelbraun gefärbten, nicht aufgeschlossenen Zellen und zum anderen Teil aus hellgelb gefärbten Schwefelresten bestand. Nach der Entnahme aus dem Gradienten wurde jeweils Bande 2 zur Solubilisierung mit DDM (Kap. 2.7) eingesetzt.

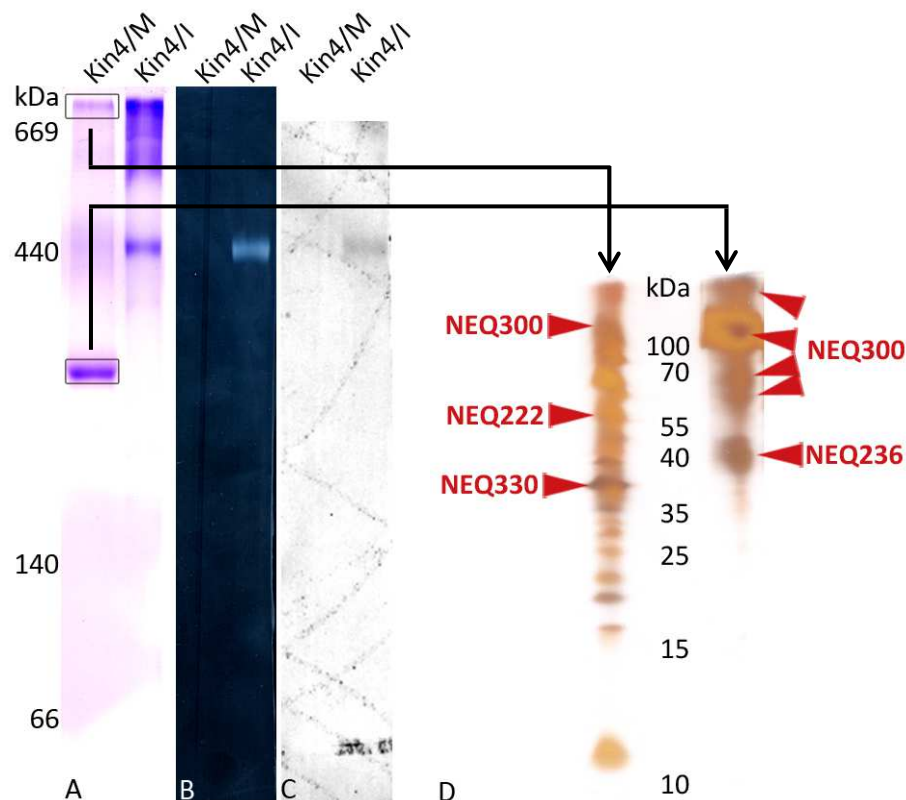
### 3.5.1.2 Analyse der Membranproteine

Die solubilisierten Proteine wurden in einem Nativgel aufgetrennt. In der Fraktion Kin4/M trat eine stark ausgeprägte Bande zwischen 140 und 440 kDa auf (Abb. 3.31 A). Darüber hinaus waren eine schwache, diffuse Bande bei ca. 440 kDa sowie eine Bande oberhalb von 669 kDa zu sehen. Keine dieser Banden zeigte Aktivität im ATPase In-Gel-Assay (Abb. 3.31 B) oder reagierte mit dem Antikörper gegen den A<sub>1</sub>-Subkomplex (Abb. 3.31 C), obwohl die Bande bei 440 kDa wohl den A<sub>1</sub>-Subkomplex von *I. hospitalis* darstellt. Auch mit Antikörpern gegen die Untereinheiten B bzw. a konnten keine Signale im Western Blot erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Die Bande von großer apparanter molekularer Masse wurde in der zweiten Dimension im SDS-Gel in eine Vielzahl von Banden aufgetrennt, von denen drei mittels MALDI-TOF MS/MS als NEQ300, NEQ222 und NEQ330 identifiziert werden konnten (Abb. 3.31 D). Die übrigen Banden stammten entweder von Proteinen aus *I. hospitalis* und stellten zum Teil Untereinheiten dessen ATP-Synthase/ATPase dar, oder konnten nicht zugeordnet werden. In der prominenten Bande zwischen 140 und 440 kDa dominierten die Proteine NEQ300 und NEQ236 (Abb. 3.31 D), die den S-Layer sowie ein S-Layer assoziiertes Protein repräsentieren (Gürster, 2007).

In der Fraktion Kin4/I trat eine Bande bei ca. 440 kDa auf (Abb. 3.31 A), die sowohl ATPase-Aktivität besaß (Abb. 3.31 B) als auch mit dem Antikörper gegen den A<sub>1</sub>-Subkomplex reagierte (Abb. 3.31 C). Des Weiteren war in dieser Spur ein Schmier bei einer apparenten

molekularen Masse von ca. 669 kDa zu sehen, der weder ATP-Hydrolyseaktivität besaß (Abb. 3.31 B) noch mit Antikörpern gegen den A<sub>1</sub>-Subkomplex (Abb. 3.31 C) oder gegen die Untereinheiten B bzw. a reagierte (Daten nicht gezeigt).

In der Fraktion Kin4/M war also vornehmlich der S-Layer von *N. equitans* enthalten, während in der Fraktion Kin4/I wohl die ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* dominierte.

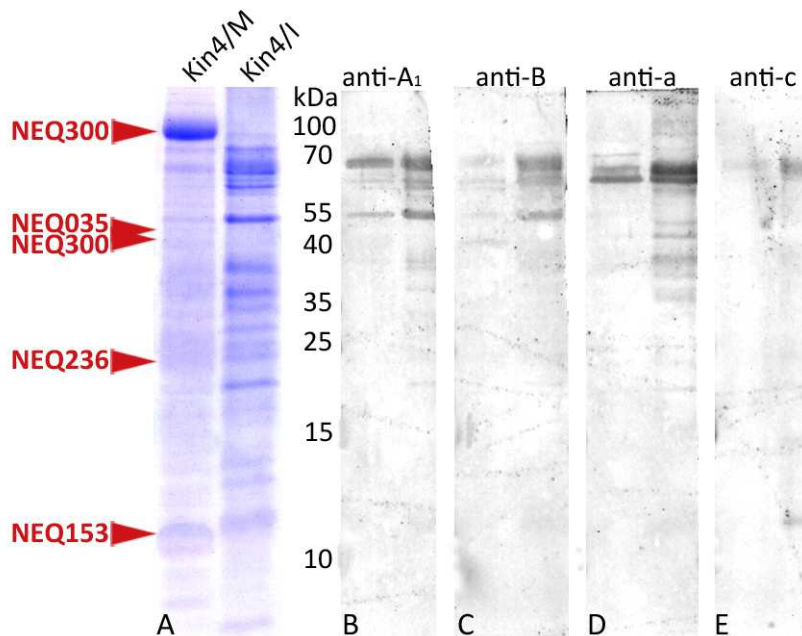


**Abb. 3.31 CNE der Solubilisate von Kin4/M und Kin4/I bei pH 8,0 sowie Untereinheitenkomposition der Proteinkomplexe aus Kin4/M.** Je 30 µg Protein; A: CNE (5 – 13 %), Coomassie-Färbung; B: CNE (5 – 13 %), ATPase In-Gel-Assay; C: Western Blot mit anti-atp A<sub>1</sub> (*I. hospitalis*, 1:5000), sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + DyLight 650 (1:2500); D: SDS-PAGE nach Schagger (2. Dimension, 12 %) der in A markierten Proteinkomplexe, Silberfärbung; rot gekennzeichnet sind durch Peptidmassen-Fingerabdruck identifizierte Proteine aus *N. equitans*

Des Weiteren wurden die solubilisierten Membranproteine in einer SDS-PAGE nach Schagger aufgetrennt. Zusätzlich zu Western Blot-Analysen wurden einzelne Banden mittels MALDI-TOF MS/MS untersucht, wobei hierfür Banden gewählt wurden, die zum einen nur in der Kin4/M-Fraktion und zum anderen auf der Höhe der erwarteten Molekülmassen der ATP-Synthase/ATPase-Untereinheiten von *N. equitans* auftraten. Diese liegen bei ca. 65 kDa für die Untereinheit A, 54 kDa für a, 47 kDa für B, 24 kDa für D und 7 kDa für die c-Untereinheit. In der Fraktion Kin4/M trat im Coomassie-gefärbten Gel eine Bande mit einer apparenten molekularen Masse von etwa 100 kDa deutlich hervor (Abb. 3.32 A). Diese wurde als NEQ300 (S-Layer-Protein) identifiziert. Die übrigen Banden waren sehr schwach ausgeprägt. Mittels MALDI-TOF MS/MS konnten die Proteine NEQ035, NEQ153, NEQ236 sowie nochmals NEQ300 identifiziert werden. Alle weiteren untersuchten Banden stellten entweder Proteine



aus *I. hospitalis* dar oder konnten nicht zugeordnet werden. Darüber hinaus waren im Western Blot Signale mit Antikörpern gegen den A<sub>1</sub>-Subkomplex und die Untereinheit B (jeweils bei ca. 70 und 55 kDa, Abb. 3.32 B und C) sowie mit Antikörpern gegen die Untereinheit a (bei ca. 70 kDa, Abb. 3.32 D) zu sehen. Für die Untereinheit c konnte ein sehr schwaches Signal bei ca. 70 kDa detektiert werden (Abb. 3.32 E).



**Abb. 3.32 SDS-PAGE nach Schägger (12 %) der Solubilisate von Kin4/M und Kin4/I bei pH 8,0.** Je 30 µg Protein; A: Coomassie-Färbung; B: Western Blot (WB) mit anti-atp A<sub>1</sub> (*I. hospitalis*, 1:5000); C: WB mit anti-atp B (*M. jannaschii*, 1:5000); D: WB mit anti-atp a (rec) (*I. hospitalis*, 1:25000); E: WB mit anti-atp c (syn) (*I. hospitalis*, 1:1000); sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + DyLight 650 (1:2500); rot gekennzeichnet sind durch Peptidmassen-Fingerabdruck identifizierte Proteine aus *N. equitans*

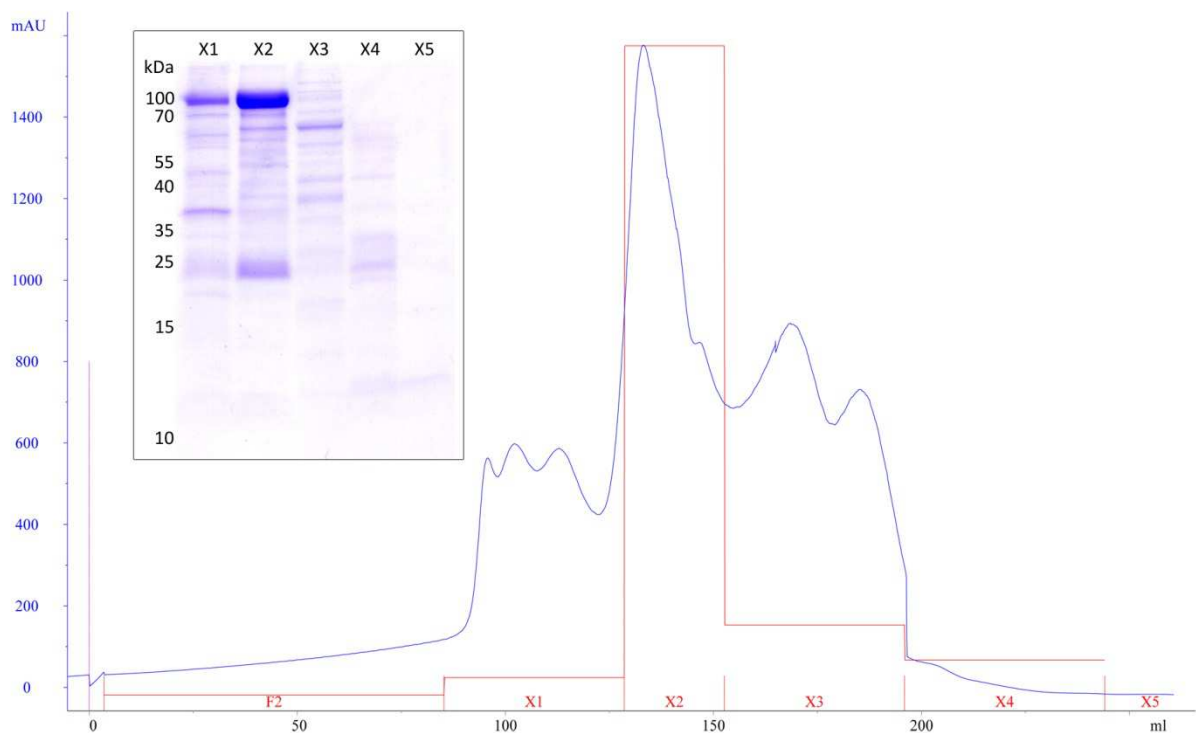
In der Fraktion Kin4/I war eine Vielzahl von Banden zu sehen, jedoch fehlte die markante Bande bei 100 kDa (Abb. 3.32 A). Hier konnten mittels Western Blot der A<sub>1</sub>-Subkomplex bzw. die Untereinheit B (Abb. 3.32 B und C) sowie die Untereinheiten A und c (Abb. 3.32 D und E) nachgewiesen werden. Da die Western Blot-Signale der Antikörper gegen Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase in Kin4/M und Kin4/I übereinstimmen, ist davon auszugehen, dass diese auch in der Mischkultur von den entsprechenden Untereinheiten aus *I. hospitalis* stammen.

### 3.5.1.3 Chromatographische Reinigung

Da das S-Layer-Protein NEQ300 die Kin4/M-Präparation dominierte und dadurch andere Proteine deutlich unterrepräsentiert waren, wurde versucht, die Proteinkomplexe in einer Gelfiltration zu separieren. Der Komplex aus NEQ300 (100 kDa) und NEQ236 (ca. 38 kDa) weist im Nativgel eine apparente molekulare Masse von etwa 200 – 300 kDa auf. Aufgrund des hydrophoben Charakters der Proteine ist die genaue Bestimmung der Molekülmasse im



Nativgel jedoch schwierig. Es könnte sich um ein Aggregat von zwei NEQ300 mit ein oder zwei NEQ236 handeln. In einer Gelfiltration sollte er aber von der ATP-Synthase/ATPase bzw. deren  $A_1$ -Subkomplex unterscheidbar sein. Hierfür wurde eine HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR-Säule eingesetzt. Die Trennung erfolgte bei max. 0,5 ml/min und das Eluat wurde in Fraktionen zu 45 bzw. 25 ml fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihre ATP-Hydrolyseaktivität getestet und in einer SDS-PAGE analysiert.



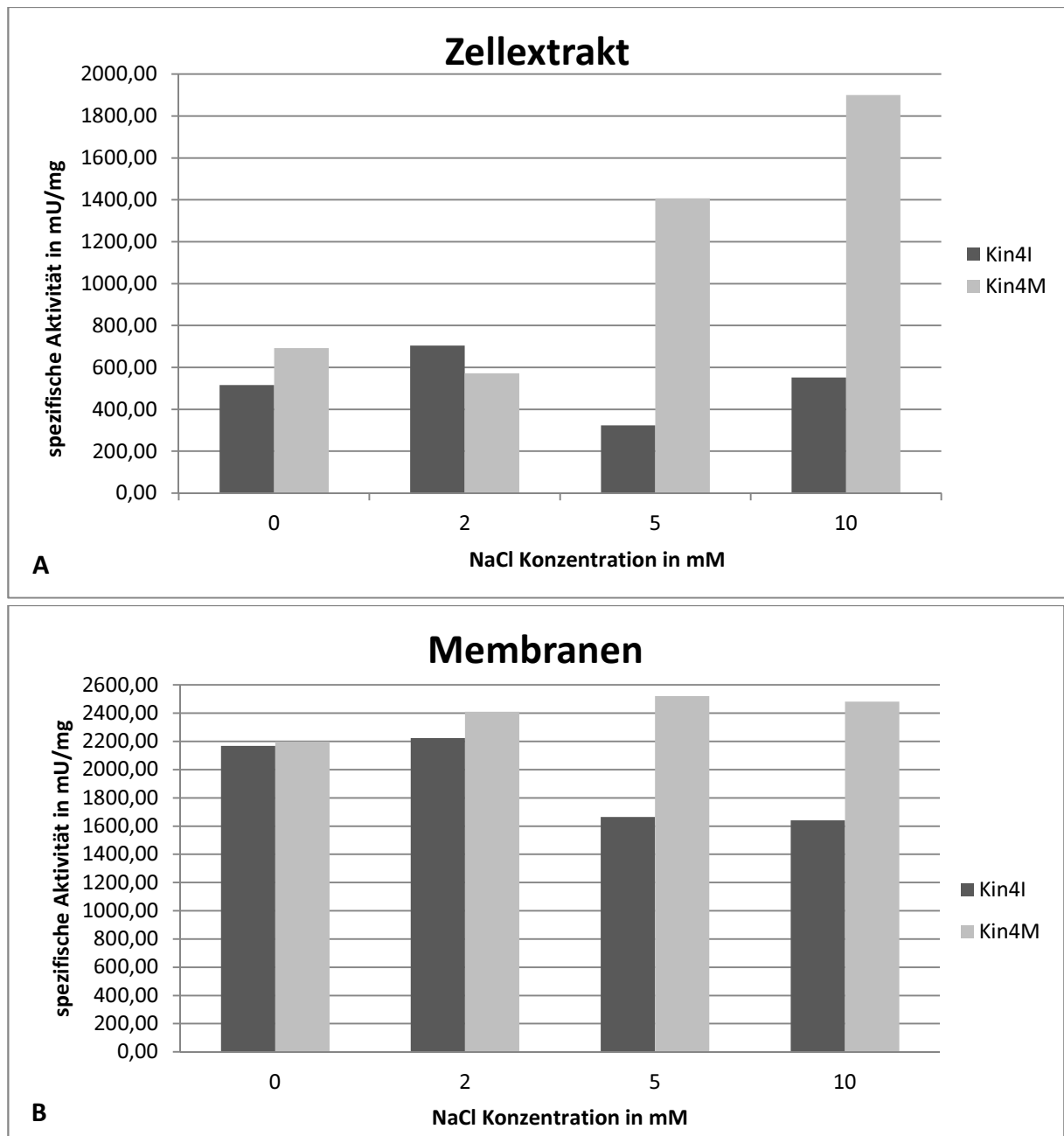
**Abb. 3.33 Chromatogramm der Gelfiltrationschromatographie (HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR) von Kin4/M bei pH 8,0.** Fraktionsgröße 45 bzw. 25 (X2) ml. blau (—): UV-Absorption bei 280 nm; rot (—): ATP-Hydrolyseaktivität; Insert: SDS-PAGE nach Schägger (12 %) der Fraktionen X1 bis X5, Coomassie-Färbung

Der höchste Proteinpeak trat in der Fraktion X2 auf, die gleichzeitig die höchste Aktivität besaß (Abb. 3.33). Die übrigen Fraktionen enthielten entweder kaum Protein oder besaßen keine ATP-Hydrolyseaktivität. Das SDS-Gel zeigte, dass in der Fraktion X2 auch das S-Layer-Protein bei 100 kDa dominierte und somit eine Trennung der Proteinkomplexe nicht erfolgreich war.

Die verwendete Säule (HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR) hat bereits, unter anderem aufgrund ihrer Größe, ein gutes Auflösungsvermögen, so dass eine bessere Trennung der beiden Komplexe mittels Gelfiltration höchstens durch eine feinere Fraktionierung möglich ist. Eine alternative Methode wäre eine Immunpräzipitation beispielsweise mit magnetischen Beads, die an Antikörper gegen das S-Layer-Protein gekoppelt sind. Somit könnte der Anteil des S-Layer-Proteins im Solubilisat zumindest reduziert werden und eine Analyse der übrigen Proteine wäre besser möglich.

#### 3.5.1.4 Versuche zur Natriumionen-Abhängigkeit der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans*

Bioinformatische Untersuchungen der membranständigen Untereinheit c von *N. equitans* haben gezeigt, dass diese die beiden für die Translokation von Natriumionen erforderlichen Motive I (Q<sup>22</sup>) und II (E<sup>51</sup>T<sup>52</sup>) besitzt (Küper, 2010; Grüber et al., 2014). Um die Natriumionen-Abhängigkeit der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* experimentell nachzuweisen, wurden Zellen der Mischkultur Kin4/M, von denen freie *N. equitans*-Zellen abgetrennt worden waren, in „FfM“ Lysepuffer mittels Frech Press aufgeschlossen und durch zweimalige niedertourige Zentrifugation (3000 bzw. 6000 g) von groben Zellbestandteilen gereinigt. Diese Probe wurde als Zellextrakt bezeichnet. Anschließend wurden durch Ultrazentrifugation die Membranen sedimentiert und in „FfM“ Lysepuffer aufgenommen. Der Überstand der Ultrazentrifugation wurde als Cytoplasma bezeichnet, das Pellet als Membranen. Von allen so erhaltenen Proben wurden mittels Longtest (Kap. 2.13.1.2) die ATP-Hydrolyseaktivitäten bestimmt, wobei ausschließlich mit Plastikwaren gearbeitet wurde, um die Kontamination mit Na<sup>+</sup> zu minimieren. Dem ansonsten Na<sup>+</sup>-freien Reaktionspuffer wurde NaCl in Konzentrationen von 0 bis 10 mM zugegeben. Als Substrat diente Mg<sup>2+</sup>-ATP anstatt dem üblicherweise verwendeten (Na<sup>+</sup>)<sub>2</sub>-ATP. Als Kontrolle wurden Zellen der Reinkultur von *I. hospitalis* Kin4/I verwendet, die identisch behandelt und getestet wurden. Erste Versuche zur Natriumionen-Abhängigkeit der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* wurden im Rahmen eines mehrwöchigen Aufenthalts in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Müller an der Goethe Universität in Frankfurt/Main gemeinsam mit Florian Mayer durchgeführt. Hier konnte für den Zellextrakt der Mischkultur Kin4/M mit steigender NaCl-Konzentration ein deutlicher Anstieg der spezifischen Aktivität von ca. 700 auf ca. 1900 mU/mg Protein festgestellt werden (Abb. 3.34 A). Die Werte der spezifischen Aktivität des Zellextraktes von Kin4/I dagegen bewegten sich in einem Bereich zwischen etwa 300 und 700 mU/mg. Diese Ergebnisse konnten im Labor in Regensburg bislang nicht reproduziert werden. Um auszuschließen, dass die beobachtete Reaktion durch cytoplasmatische ATP-hydrolysierende Proteine hervorgerufen wurde, wurden die Versuche zunächst mit Membranen durchgeführt. Die spezifischen Aktivitäten der Membranen von Kin4/M stiegen mit steigender NaCl-Konzentration lediglich von ca. 2200 auf 2500 mU/mg an (Abb. 3.34 B), was nicht auf eine Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit hindeutet. Auch für den Zellextrakt konnte keine Abhängigkeit der ATP-Hydrolyseaktivität von der NaCl-Konzentration mehr nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.34 Spezifische ATPase-Aktivitäten von Kin4/I und Kin4/M in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration im Reaktionspuffer. A: Zellextrakt; B: Membranen; dunkelgrau: Kin4/I, hellgrau: Kin4/M**

Um sicher zu stellen, dass der Reaktionspuffer  $\text{Na}^+$ -frei war, wurde mit der Hilfe von Dr. Harald Huber der  $\text{Na}^+$ -Gehalt aller Komponenten mittels ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectrometry) bestimmt. Insbesondere die Substanz  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (Kaliumdisulfit/Kaliummetabisulfit) war stark mit  $\text{Na}^+$ -Ionen verunreinigt (ca.  $180 \mu\text{M}$   $\text{Na}^+$  in einer  $40 \text{ mM}$   $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$  Lösung). Aufgrund ihrer Eigenschaft, die Enzymaktivität zu stimulieren (Lemker et al., 2003), konnte auf die Substanz nicht gänzlich verzichtet werden. Deshalb wurde sie in geringerer Konzentration von  $20 \text{ mM}$  statt  $40 \text{ mM}$  eingesetzt. Dadurch belief sich die Gesamt- $\text{Na}^+$ -Konzentration im Reaktionspuffer auf ca.  $0,1 \text{ mM}$ . Als Alternative

könnte dem Puffer Sulfit durch Einleiten von SO<sub>2</sub>-Gas zugesetzt werden, wie in Pisa, 2008 beschrieben.

Zusätzlich wurden die Zellen vor dem Aufschluss in Na<sup>+</sup>-freiem ½ SME *Ignicoccus*-Medium gewaschen, um die Verschleppung von Natriumsalzen aus dem Anzuchtmedium auszuschließen.

Auch mit diesen Vorkehrungen konnte jedoch weder im Zellextrakt noch in den Membranen von Kin4/M eine Zunahme der ATP-Hydrolyseaktivität mit steigender NaCl-Konzentration im Reaktionspuffer beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen bewirkte ein Hemmstofftest mit DCCD zur Überprüfung des Kopplungszustandes der ATP-Synthase/ATPase einen Rückgang der Aktivität im Zellextrakt auf ca. 45 % (Abb. 3.35). Aufgrund dessen konnte eine Dissoziation des Enzyms in seine Subkomplexe ausgeschlossen werden.

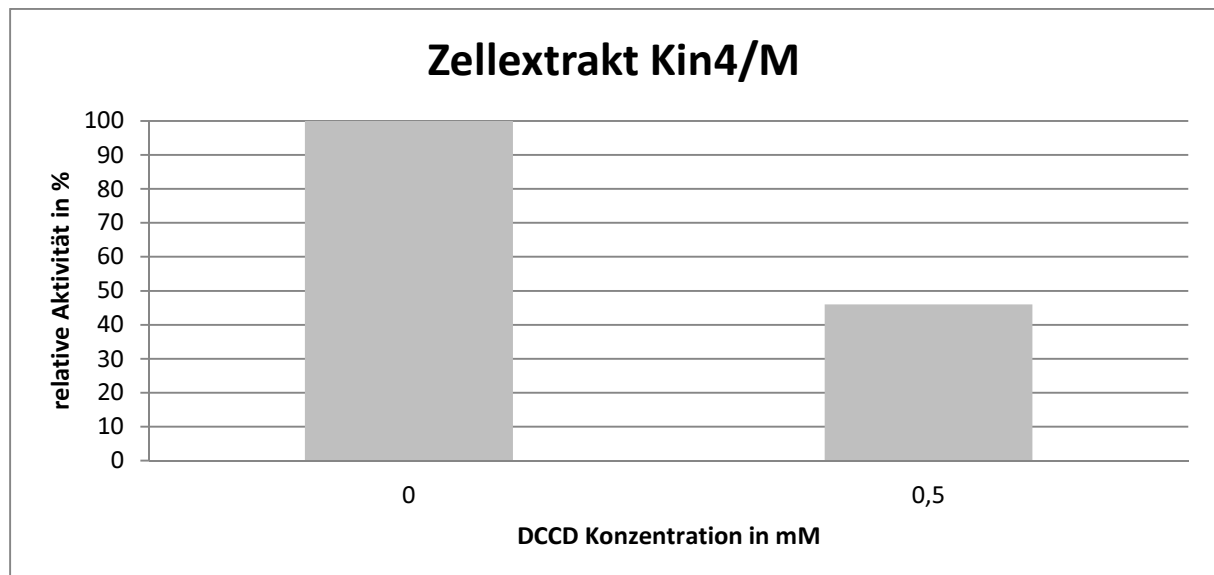


Abb. 3.35 Relative ATPase-Aktivität des Zellextraktes von Kin4/M in Abhängigkeit von der DCCD-Konzentration

### 3.5.2 Versuche zur Reinigung der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* im HEPES-Puffersystem bei pH 7,0

Neben dem etablierten Tris-Puffersystem bei pH 8,0 wurde für die Reinigung der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* auch ein Puffersystem basierend auf HEPES bei pH 7,0 getestet. Dieser pH-Wert kommt vermutlich dem der natürlichen Umgebung des Enzyms in der Cytoplasmamembran am nächsten. Erste Versuche in diesem Puffersystem erfolgten mit frischen Kin4/M-Zellen direkt nach der Ernte. Da diese jedoch kaum *N. equitans*-Zellen enthielten und dadurch Proteine aus *N. equitans* im Vergleich zu *I. hospitalis* stark unterrepräsentiert waren, musste auf Zellen aus früheren Züchtungen zurückgegriffen

werden. In diesen waren, obwohl sie nach der Ernte abgetrennt worden waren, ausreichend *N. equitans*-Zellen vorhanden. Die gefrorenen Zellen der Mischkultur wurden in HEPES Lysepuffer aufgetaut und mittels French Press aufgeschlossen. Methodische Vorarbeiten zeigten, dass im Reaktionspuffer des Aktivitätstests Tris durch HEPES ersetzt werden konnte, ohne eine signifikante Änderung der Aktivität zu bewirken. Die spezifische Aktivität eines Solubilisats von Kin4/I in Tris betrug 2600 mU/mg, während sich die Aktivität in HEPES auf 2300 mU/mg belief. In den nachfolgenden Versuchen wurde in sämtlichen Puffern und Lösungen Tris durch HEPES ersetzt.

### 3.5.2.1 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Abbildung 3.36 zeigt das Ergebnis der Ultrazentrifugation eines Dichtegradienten von

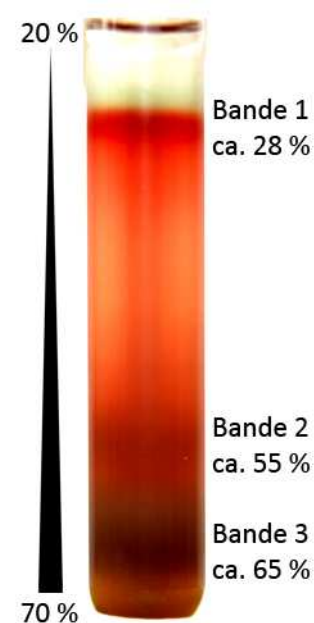


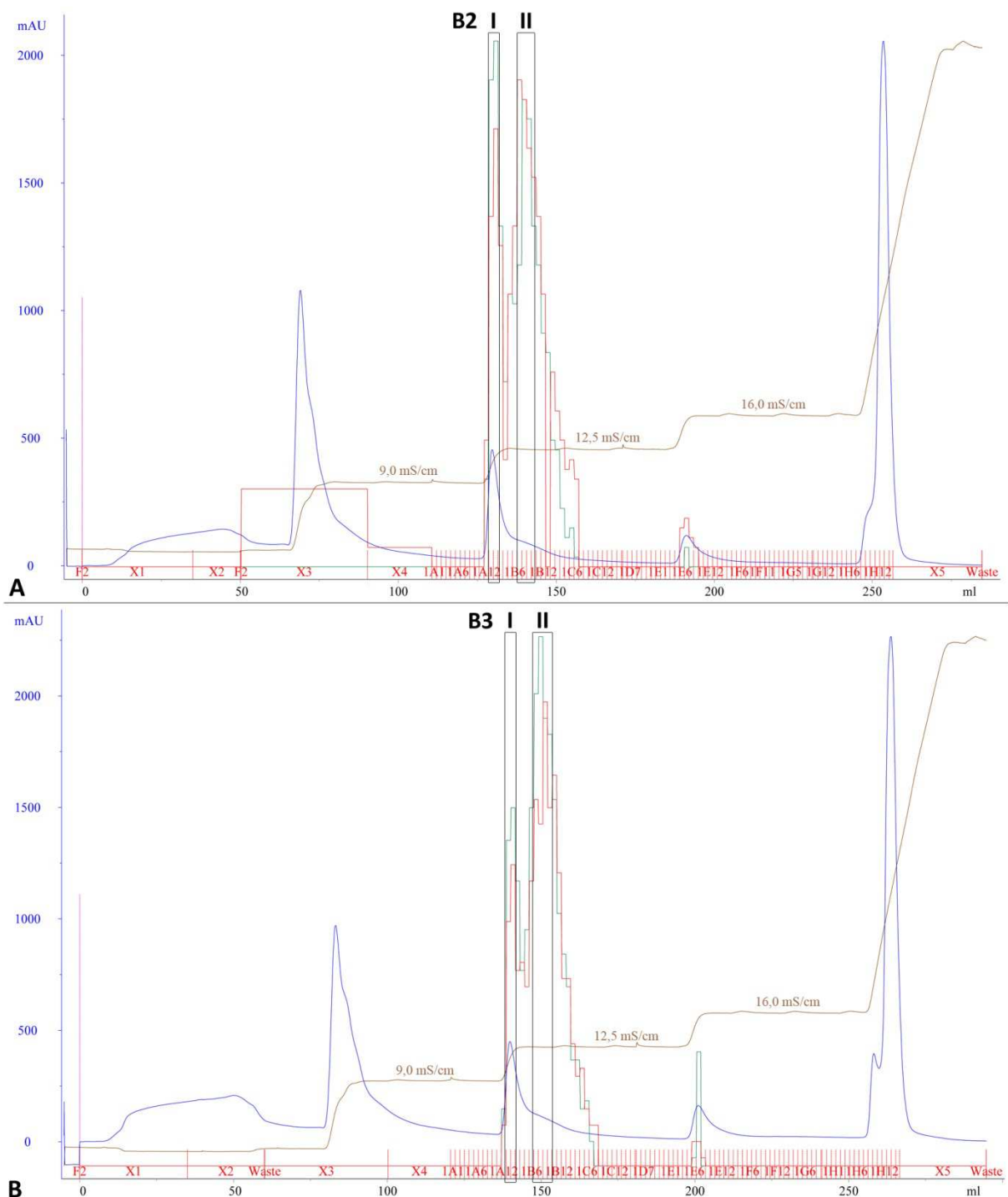
Abb. 3.36 Saccharose-Dichtegradient von Kin4/M (20 – 70 %) bei pH 7,0

Kin4/M in HEPES-Puffer bei pH 7,0. Eine rötliche, klare Bande trat bei etwa 28 % Saccharose auf und wurde als Bande 1 bezeichnet. Sie enthielt keine lichtmikroskopisch sichtbaren Partikel. Eine weitere Bande, die bräunlich und trüb erschien, lief auf einer Höhe von ca. 55 % Saccharose und wurde als Bande 2 bezeichnet. Darüber hinaus gab es eine weitere Bande (Bande 3) bei ca. 65 % Saccharose, welche dunkler gefärbt und stärker ausgeprägt war als Bande 2. Zusätzlich gab es ein Pellet am Boden des Röhrchens, dessen Bodenschicht durch Schwefelreste hellgelb gefärbt war, während die darüber liegende Schicht nicht aufgeschlossene Zellen enthielt und eine dunkelbraune bis schwarze Farbe aufwies. Sowohl Bande 2 als auch Bande 3 enthielten lichtmikroskopisch (1000fache Vergrößerung) sichtbare Partikel ( $< 1 \mu\text{m}$ ), wobei diese in Bande 3 zahlreicher auftraten. Bande 2 und Bande 3 wurden nach der Entnahme aus dem Gradienten für die Solubilisierung (Kap. 2.7) und anschließende Reinigung eingesetzt.

### 3.5.2.2 Chromatographische Reinigung

Die Solubilisate von Bande 2 bzw. 3 wurden getrennt voneinander, jedoch mit dem identischen Programm und den gleichen Laufpuffern mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Mit einer Flussrate von maximal 0,5 ml/min wurden sie auf drei in Reihe geschaltete Anionenaustauscher (HiTrap Q HP) aufgetragen. Die Elution erfolgte durch stufenweise Erhöhung der Leitfähigkeit (9,0 mS/cm, 12,5 mS/cm und 16,0 mS/cm), wobei die Puffer manuell gewechselt wurden. Abschließend folgte eine Stoßelution mit 1 M NaCl. Von allen proteinenthaltenden Fraktionen wurde die ATP-Hydrolyseaktivität mittels ‚Quicktest‘ bestimmt. Dieser wurde jeweils einmal in AMPSO-

Reaktionspuffer bei pH 9,0 und in HEPES-Reaktionspuffer bei pH 7,0 durchgeführt, um den jeweiligen vermuteten Aktivitätsoptima der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* bzw. *N. equitans* zu entsprechen.



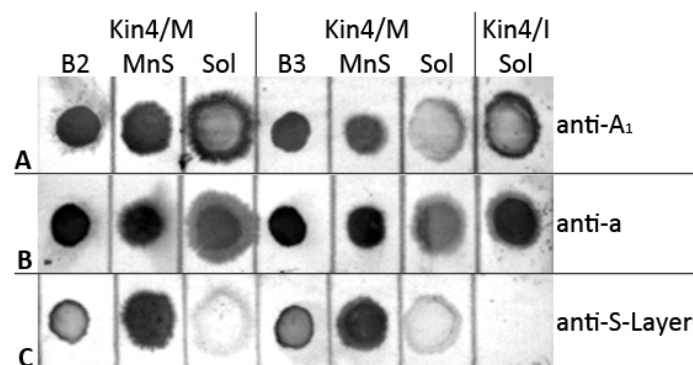
**Abb. 3.37** Chromatogramme der Anionenaustauschchromatographien (HiTrap Q HP) von Bande 2 (A) und Bande 3 (B) bei pH 7,0. Fraktionsgröße 2 ml. Schwarz markiert sind jeweils die Fraktionen, die für die weitere Verarbeitung vereinigt wurden (B2 bzw. B3 I und II); blau (—): UV-Absorption bei 280 nm; braun (—): Leitfähigkeit; rot (—): ATP-Hydrolyseaktivität in AMP<sub>SO</sub>, pH 9,0; grün (—): ATP-Hydrolyseaktivität in HEPES, pH 7,0

In Abbildung 3.37 sind die beiden Chromatogramme der Anionenaustauschchromatographien von Bande 2 und Bande 3 gegenübergestellt. Die Elutionsmuster beider Proben ähnelten sich stark. Mit jeder Erhöhung der Leitfähigkeit ging eine Elution von Protein einher. Bei 12,5 mS/cm zeigte sich ein scharfer Proteinpeak, gefolgt von einer Schulter, die jeweils ATP-Hydrolyseaktivität besaßen. Die Hydrolyseaktivität war in beiden Reaktionspuffern vergleichbar hoch. Die Fraktionen mit der jeweils höchsten Aktivität wurden vereinigt und als B2 I und II bzw. als B3 I und II bezeichnet.

Der zweite Peak stellt vermutlich den  $A_1$ -Subkomplex von *I. hospitalis* dar, während der erste wohl den Gesamtkomplex enthält. Bei pH 7,0 wurde also, im Gegensatz zu bisher durchgeführten Reinigungen, der gekoppelte Komplex schon vor dem  $A_1$ -Subkomplex bei einer Leitfähigkeit von 12,5 mS/cm eluiert. Der gekoppelte Komplex zeigt demnach eine stärkere Abhängigkeit der Oberflächenladung vom pH-Wert als der  $A_1$ -Subkomplex und weist bei niedrigerem pH-Wert weniger negative Ladungen auf. Damit bindet er weniger stark an das positiv geladene Säulenmaterial und wird bei einer geringeren Leitfähigkeit und damit Salzkonzentration des Puffers eluiert (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2010).

### 3.5.2.3 Analyse der Membranproteine

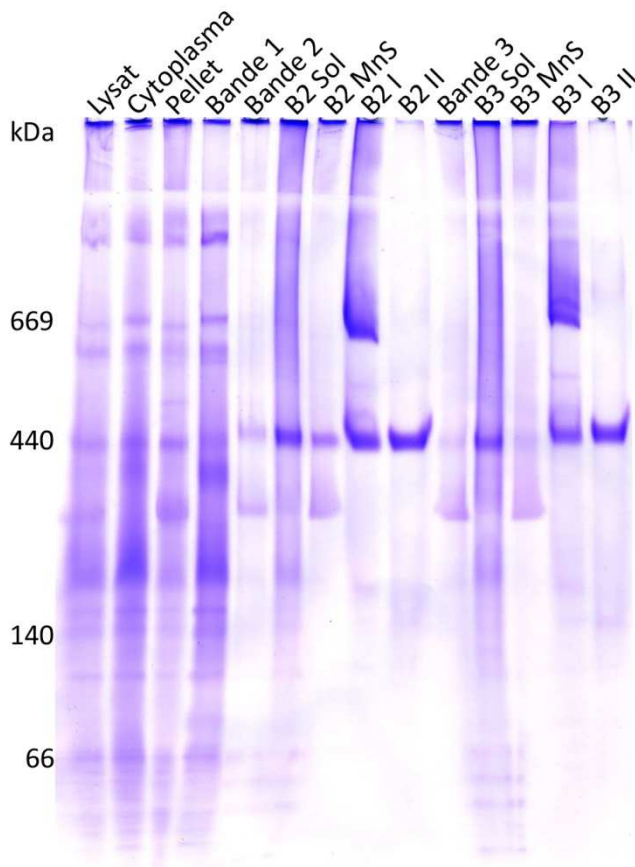
Bande 2 und 3 aus dem Saccharosegradienten sowie deren Solubilisate wurden mittels Dotblot auf das Vorhandensein von Proteinen aus *I. hospitalis* bzw. *N. equitans* getestet. In beiden Banden konnten sowohl der  $A_1$ -Subkomplex und die Untereinheit a der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* als auch das S-Layer-Protein von *N. equitans* nachgewiesen werden (Abb. 3.38).



**Abb. 3.38** Dotblot von Bande 2 und 3 aus dem Saccharosegradienten sowie deren Solubilisaten (Sol) und Membranen nach Solubilisierung (MnS). A: anti-atp  $A_1$  (*I. hospitalis*, 1:5000); B: anti-atp a (rec) (*I. hospitalis*, 1:25000); C: anti-S-Layer (*N. equitans*, 1:5000); sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + DyLight 650 (1:2500); Kontrolle: Solubilisat von Kin4/I

Während die ATP-Synthase/ATPase-Untereinheiten nach der Solubilisierung sowohl im Solubilisat (Sol) als auch in den Membranen nach Solubilisierung (MnS) zu finden waren, verblieb das S-Layer-Protein zum größten Teil in der Membranfraktion. Das als Kontrolle

mitgeführte Solubilisat von Kin4/I reagierte gut mit den Antikörpern gegen den A<sub>1</sub>-Subkomplex und die Untereinheit  $\alpha$ , jedoch nicht mit dem Antikörper gegen das S-Layer-Protein.



**Abb. 3.39** CNE (5 – 13 %) des Reinigungsverlaufs von Kin4/M bei pH 7,0. Je 20 µg Protein; Coomassie-Färbung

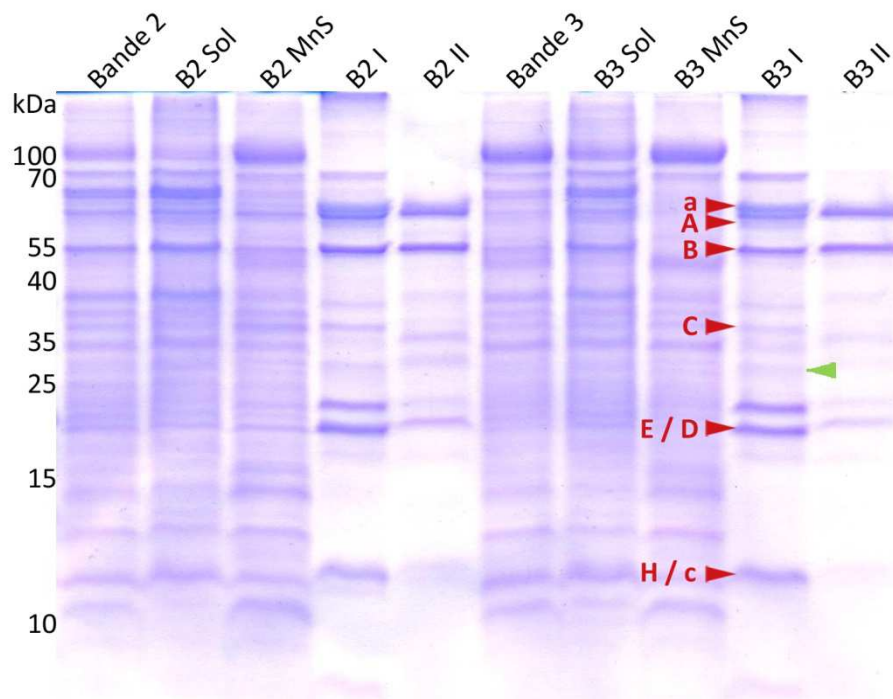
Der Reinigungsverlauf wurde in einem Nativgel dokumentiert (Abb. 3.39). Die Bandenmuster in den Spuren von Bande 2 und 3 sowie deren Solubilisaten und Fraktionen nach der Anionenaustauschchromatographie waren nahezu identisch. Es war jeweils eine Anreicherung eines Proteinkomplexes von ca. 440 kDa in den Fraktionen nach der Reinigung zu erkennen (B2 I und II bzw. B3 I und II). In B2 I bzw. B3 I trat zusätzlich ein Proteinkomplex mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 669 kDa auf. Diese beiden Komplexe stellen den A<sub>1</sub>- bzw. A<sub>0</sub>-Subkomplex von *I. hospitalis* dar. Ein weiterer Proteinkomplex zwischen 140 und 440 kDa, erfahrungsgemäß der S-Layer-Proteinkomplex, war sowohl in Bande 2 als auch in Bande 3 vorhanden und verblieb nach der Solubilisierung in der Membranfraktion.

In einem SDS-Gel zeigte sich ebenfalls eine große Ähnlichkeit zwischen den Fraktionen von Bande 2 und Bande 3 (Abb. 3.40). Die markante Bande des S-Layer-Proteins bei etwa 100 kDa trat jeweils in Bande 2 und 3 sowie in den Membranen nach Solubilisierung auf. In B2 I und B3 I wurden Proteine angereichert, die in B3 I mittels MALDI-TOF MS/MS als Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* identifiziert wurden. Die übrigen Banden stellten ebenfalls Proteine aus *I. hospitalis* dar. Eine Bande zwischen 25 und 35 kDa gab als dritten Treffer ein hypothetisches Protein aus *N. equitans* (NEQ444, Score 142; Scores von 200 oder mehr waren eindeutig). Dieses stellte das einzige identifizierte nanoarchaeelle Protein in dieser Präparation dar (Abb. 3.40, grüner Pfeil).

Da die beiden Banden B2 und B3 aus dem Saccharosegradienten offensichtlich das gleiche Proteinspektrum aufweisen, ist es unwahrscheinlich, dass sie die Membranen von *I. hospitalis* und *N. equitans* repräsentieren und diese im Dichtegradienten getrennt wurden. Die Analysen der Membranproteine legen den Schluss nahe, dass in diesem Versuch bei pH 7,0 die Membranen von *N. equitans* nicht oder nur in sehr geringem Maße solubilisiert wurden. Zum einen verblieb das S-Layer-Protein, und damit vermutlich auch andere



Membranproteine, nach der Solubilisierung offensichtlich in der Membranfraktion und zum anderen waren in den gereinigten aktiven Fraktionen bis auf eine Ausnahme nur Proteine von *I. hospitalis* nachweisbar. Möglicherweise ist die Solubilisierungsreaktion, die im Tris-Puffersystem bei pH 8,0 optimiert wurde (Küper, 2010), bei pH 7,0 weniger effektiv, was sich anscheinend insbesondere auf Membranproteine und S-Layer von *N. equitans* auswirkt. Andererseits konnten in früheren Arbeiten die Untereinheiten A, B und a der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* in Proteinextrakten der Mischkultur nachgewiesen werden, die bei pH 7,2 präpariert worden waren (Burghardt, 2008). Eine endgültige Aussage diesbezüglich kann nur nach Wiederholung des Versuchs getroffen werden.



**Abb. 3.40 SDS-PAGE nach Schägger (12 %) von Bande 2 und 3 bei pH 7,0 sowie deren gereinigten Fraktionen.** Je 20 µg Protein; Coomassie-Färbung; rot gekennzeichnet sind die durch Peptidmassen-Fingerabdruck identifizierte Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis*; grün gekennzeichnet ist das einzige gefundene nanoarchaeelle Protein NEQ444

### 3.6 Nachweis der Untereinheit c der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans*

Zur Isolierung kleiner, hydrophober Membranproteine wurden Zellen der Mischkultur Kin4/M nach Abtrennung freier *N. equitans*-Zellen zunächst in ‚FfM‘ Lysepuffer aufgeschlossen und wie beschrieben die Membranen präpariert (Kap. 2.6.1). Parallel wurde der gleiche Versuch im kleinen Maßstab mit *N. equitans*-Zellen durchgeführt, die nach der Ernte als freie Zellen abgetrennt worden waren. Membranproteine wurden mit

Chloroform/Methanol aus den Membranen extrahiert (Kap. 2.8). Nach Fällung der extrahierten Proteine wurden sie in eine wässrige Phase überführt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels MALDI-TOF MS/MS untersucht. Zusätzlich wurde die c-Untereinheit von *N. equitans* bioinformatisch analysiert.

### 3.6.1 Biochemische Analyse

Nach Auftrennung der Chloroform/Methanol-Extrakte in einem SDS-Gel war eine Vielzahl von Banden von kleiner apparanter molekularer Masse (< 15 kDa) zu sehen (Abb. 3.41). Im Extrakt von Kin4/M konnten nach Verdau mit Chymotrypsin bzw. einer Kombination aus Trypsin und Chymotrypsin neben einem Lysinexporterprotein (LysE/YggA aus *I. hospitalis*), dem hypothetischen Protein Igni\_0798 sowie dem Protein lhomp1 (Igni\_1266) auch beide c-Untereinheiten der ATP-Synthasen/ATPasen von *I. hospitalis* und *N. equitans* identifiziert werden (Abb. 3.41 A; Anhang E).

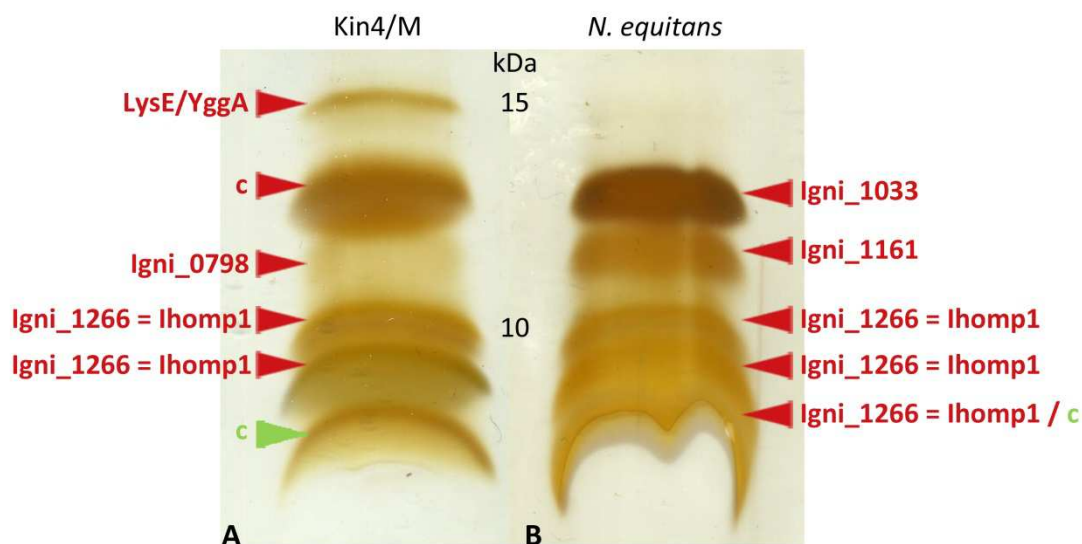


Abb. 3.41 SDS-PAGE nach Schägger (15 %) der Chloroform/Methanol-Extrakte von Kin4/M (A) und *N. equitans* (B). Silberfärbung; rot gekennzeichnet sind durch Peptidmassen-Fingerabdruck identifizierte Proteine von *I. hospitalis*; grün gekennzeichnet sind durch Peptidmassen-Fingerabdruck identifizierte Proteine von *N. equitans*

Im Extrakt von *N. equitans* dagegen konnten keine Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3.41 B). Hier waren wieder das Protein lhomp1 (Igni\_1266) sowie zwei hypothetische Proteine aus *I. hospitalis* (Igni\_1033 und Igni\_1161) zu finden. Lediglich für die unterste Bande aus dem Gel war der zweite Treffer die c-Untereinheit der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans*.

### 3.6.2 Bioinformatische Analyse

Die Untereinheit c der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* ist annotiert als Protein NEQ217 (NCBI) mit einer Länge von 69 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 6,8 kDa. Für dieses Protein werden mit Programmen zur Vorhersage von Transmembranhelices wie TMHMM oder TMPred zwei Transmembranhelices vorhergesagt. Programme wie SOSUIsignal oder Phobius dagegen sagen eine Transmembranhelix und ein Signalpeptid zwischen 29 und 34 Aminosäuren Länge voraus. Darüber hinaus besitzt die c-Untereinheit von *N. equitans* ein typisches Na<sup>+</sup>-Bindemotiv (Grüber et al., 2014), welches in der unten stehenden Sequenz rot markiert ist.

NEQ217 (*N. equitans*):

MDLALASALAIGLAAFGSAIAQGLAASAAAAATSEKPD LFGKMLIFAALPETQAIYGLVIAYLLLSKIV

## 4 Diskussion

*Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans* bilden eine besondere Lebensgemeinschaft zweier Archaeen. Derzeit werden verschiedene Teilbereiche dieser Interaktion untersucht, wie beispielsweise die Kontaktstelle und die Protein- und Stofftransportsysteme beider Organismen (Heimerl, 2014, u. a. Kooperation mit Dr. Bertram Daum, Frankfurt/Main; laufende Doktorarbeiten von Stefanie Daxer und Pia Wiegmann). In dieser Arbeit sollte der Energiestoffwechsel in dem Organismensystem *I. hospitalis* – *N. equitans* erforscht werden. In früheren Arbeiten wurden bereits Methoden zur Reinigung und Charakterisierung des Enzyms von *I. hospitalis* entwickelt, um diese dann auf die ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* übertragen zu können. Da sich jedoch die ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* aufgrund ihrer Lokalisation in der äußeren Zellmembran als besonders interessant erwies und sich Hinweise auf eine möglicherweise ungewöhnliche Struktur fanden, rückte sie zunächst in den Fokus der Forschung (Küper, 2010). Bislang war es jedoch nicht gelungen, den Gesamtkomplex der ATP-Synthase/ATPase zu reinigen, weshalb diesbezügliche Versuche intensiviert werden sollten, um Aufschlüsse über dessen Struktur zu erhalten. Des Weiteren sollten die Enzyme aus *I. pacificus* und *I. islandicus* isoliert werden, um vorhandene Gemeinsamkeiten und Unterschiede der ATP-Synthase/ATPase innerhalb der Gattung *Ignicoccus* zu beschreiben sowie um spezifische Antikörper zu generieren. Dies sollte es ermöglichen, eindeutige Ergebnisse in Immunmarkierungsversuchen an Ultradünnschnitten zu erzielen (Flechsler, 2010). Schließlich sollten auch Versuche unternommen werden, die ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* zu isolieren, um diese hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Synthese und Hydrolyse von ATP sowie ihrer Struktur zu analysieren.

### 4.1 Die ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis*

In Experimenten zur Reinigung und Charakterisierung der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* ist es bislang nicht gelungen, den gekoppelten ATP-Synthasekomplex so zu reinigen, dass strukturelle Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Den Genomdaten zufolge müsste dieser eine molekulare Masse von ca. 657 – 673 kDa aufweisen (vgl. Tab. D.1), wenn man von einer für A-Typ ATP-Synthasen/ATPasen typischen Stöchiometrie von  $A_3B_3CDE_2FH_{2ac_{10-12}}$  ausgeht (Grüber et al., 2014). Falls das Enzym von *I. hospitalis* nur einen peripheren Stiel besitzt, worauf eine LILBID-Analyse des  $A_1$ -Subkomplexes hindeutet

(Küper, 2010), ergäbe sich eine Stöchiometrie von  $A_3B_3CDEFHac_{10-12}$  und eine molekulare Masse von 620 – 637 kDa. In Küper, 2010 und Röhl, 2010 wurde bereits postuliert, dass dieser Komplex zerfällt und der ‚ $A_1$ -Subkomplex‘ die Untereinheiten A, B, E und F enthält, während der ‚ $A_0$ -Subkomplex‘ die Untereinheiten a, c, C, D und H aufweist. Diese von der üblichen Einteilung nach löslichen und membrangebundenen Untereinheiten abweichenden Bezeichnungen wurden hier übernommen.

Die von Herrn Dr. Ulf Küper in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Müller in Frankfurt/Main entwickelten Protokolle zur chromatographischen Reinigung und zur Messung der ATP-Hydrolyseaktivität wurden zunächst übernommen (Küper, 2010) und im Verlauf der Arbeit optimiert. Der in Kreuter, 2010 etablierte Saccharosegradient wurde standardmäßig eingesetzt, da hier zum einen eine gute Anreicherung der Membranen erfolgte und zum anderen im Zellextrakt vorhandener Schwefel quantitativ abgetrennt wurde.

Zellaufschluss, Membranpräparation und Reinigung wurden sowohl in einem Puffersystem basierend auf Tris bei pH 8,0 als auch basierend auf AMPSO bei pH 9,0 durchgeführt, da angenommen wird, dass im Intermembrankompartiment (IMC) von *I. hospitalis* möglicherweise ein alkalischer pH-Wert herrscht. Dies lässt sich bioenergetisch erklären: Während des Transports von Protonen vom IMC in das umgebende Medium wirkt eine Kraft auf die Protonen – die protonenmotorische Kraft ( $pmf$  = proton motive force). Diese setzt sich zum einen aus dem pH-Gradienten ( $\Delta pH$ ) und zum anderen aus dem elektrischen Membranpotential ( $\Delta \psi$ ) zusammen und lässt sich durch folgende Gleichung beschreiben:

$$pmf = \Delta \psi - 2,3 (RT/F) \Delta pH (mV)$$

R ist die Gaskonstante, T die absolute Temperatur in K und F die Faraday-Konstante. Der Effekt der Differenz einer pH-Einheit ( $\Delta pH = 1$ ) ist somit  $2,3 (RT/F)$ , was bei einer Temperatur von 80°C einem Potential von 70 mV entspricht. Unter physiologischen Bedingungen ist dieses negativ (Albers et al., 2001). Davon ausgehend, dass ein physiologisches Potential von -180 mV notwendig ist, um die ATP-Synthese anzutreiben (Müller et al., 2005a), muss demnach ein pH-Gradient von etwa drei ‚Stufen‘ an der äußeren Zellmembran von *I. hospitalis* anliegen. Dies stimmt in etwa mit den Ergebnissen aus ATP-Synthese-Experimenten an ganzen *I. hospitalis*-Zellen überein, in denen erst ab einem künstlich angelegten  $\Delta pH$  von 2 – 3 ATP-Syntheseaktivität gemessen werden konnte (Mayer, 2008). Bei einem für das Wachstum optimalen pH-Wert von pH 5,5 – 6,0 im Medium bedeutet das für *I. hospitalis*, dass im IMC ein pH-Wert von 8,5 – 9,0 herrschen müsste. Diese Annahme wird bekräftigt durch die Tatsache, dass der Hydrogenasekomplex von *I. hospitalis* *in vitro* ein Aktivitätsoptimum bei pH 8,5 besitzt (Forth, 2010). Dieser ist, wie die ATP-Synthase/ATPase, in der äußeren Zellmembran lokalisiert (Küper et al., 2010). Demzufolge wurde angenommen, dass sich ein höherer pH-Wert von 9,0 positiv auf die Stabilität der

ATP-Synthase/ATPase auswirken könnte, da dies dem pH-Wert in ihrer ‚physiologischen‘ Umgebung nahe kommt.

Die Puffersubstanz AMPSO wurde gewählt, da sie einen  $pK_a$ -Wert von 9,0 hat. Sie stellt eine Modifikation der sog. Good-Puffer dar und ist im Gegensatz zu Tris kein primäres Amin und damit deutlich weniger reaktiv (Good et al., 1966).

Beim Vergleich der Reinigungen bei pH 8,0 und pH 9,0 fällt zunächst auf, dass bei pH 8,0 fast alle ATP hydrolysierenden Proteinkomplexe gemeinsam von der Anionenaustauschersäule eluierten. Sie wurden erst während der Gelfiltration nahezu quantitativ in  $A_1$ - und  $A_0$ -Subkomplexe getrennt. Eine detaillierte Aussage über die Untereinheitenzusammensetzung der einzelnen Proteinkomplexe war hier nicht möglich. Jedoch wurden in der Fraktion der  $A_0$ -Subkomplexe neben den Untereinheiten a und c auch in vergleichsweise geringen Mengen die Untereinheiten A und B nachgewiesen. Darüber hinaus war die Untereinheit H enthalten, die Teil des peripheren Stiels ist.

In den Versuchen bei pH 8,0 eluierten somit zwar die beiden Subkomplexe gemeinsam von der Anionenaustauschersäule, jedoch geben frühere Versuche Grund zu der Annahme, dass diese nicht mehr gekoppelt vorliegen (Kreuter, 2010). Zudem wird aus der Gelfiltration deutlich, dass noch Verunreinigungen von nur geringfügig kleinerer molekularer Masse als der des  $A_1$ -Subkomplexes vorhanden sind.

Im Puffersystem bei pH 9,0 sind für Zellaufschluss und Membranpräparation zunächst keine Unterschiede im Vergleich zu pH 8,0 zu erkennen. Auch die absoluten Aktivitäten in den ATP-Hydrolysetests wiesen keine nennenswerten Unterschiede auf. Jedoch wurde die Wirkung der Hemmstoffe DCCD und TBT-Oxid anscheinend durch den höheren pH-Wert negativ beeinflusst. Die verminderte Hemmung ist nicht auf die Puffersubstanz AMPSO zurückzuführen, da auch im Tris-Puffer bei pH 9,0 die Hemmwirkung deutlich schlechter ist als bei pH 8,0.

Für DCCD, ein Carbodiimid, konnte gezeigt werden, dass es kovalent mit der konservierten sauren Seitenkette der Ionenbindestelle in der c-Untereinheit interagiert (Pogoryelov et al., 2010). Da diese für die Reaktion protoniert sein muss, nimmt die Bindung von DCCD mit steigendem pH-Wert ab (Ballmoos & Dimroth, 2007). Dies konnte auch in Mayer, 2014 gezeigt werden, wo die beste Markierung der c-Untereinheit von *Bacillus* PS3 bei einem pH-Wert von 5,5 erzielt wurde. Es wurde jedoch postuliert, dass bei einigen Organismen wie beispielsweise *Escherichia coli* statt einem Proton ( $H^+$ ) ein Hydroniumion ( $H_3O^+$ ) gebunden wird, wodurch sich die pH-Abhängigkeit verschiebt und die maximale Bindungsrate im leicht alkalischen Bereich liegt (Ballmoos & Dimroth, 2007). Aufgrund der beobachteten Ergebnisse kann dies für *I. hospitalis* ausgeschlossen werden, da im alkalischen Bereich mit DCCD kaum noch Hemmung der ATPase-Aktivität beobachtet werden kann. Jedoch müssten zur

Bestätigung Hemmstoffexperimente über einen breiteren pH-Bereich durchgeführt werden (vgl. Ballmoos & Dimroth, 2007).

Der in dieser Arbeit verwendete Hemmstoff TBT-Oxid gehört wie TBT-Cl zu den organischen Zinnverbindungen. Die Wirkung von TBT-Cl wurde bereits untersucht. Es interagiert nach dem für  $F_1F_0$  ATP-Synthasen/ATPasen vorgeschlagenen Modell nicht-kovalent mit der Untereinheit a und blockiert den Eintrittskanal für die Ionen (Ballmoos et al., 2004). Durch Markierungsversuche mit TBT-Cl und DCCD an der F-Typ ATP-Synthase/ATPase von *Bacillus* PS3 konnte dies bestätigt werden (Mayer, 2014). Neueste Experimente mit der c-Untereinheit der  $A_1A_0$  ATP-Synthase/ATPase von *P. furiosus* zeigen dagegen, dass TBT-Cl hier, ähnlich wie DCCD, mit der Ionenbindestelle interagiert. Es wurde spekuliert, dass es ebenfalls an die konservierte Glutamatseitenkette bindet und dabei ein Chloridion abgespalten wird. Letzteres scheint eine essentielle Funktion innezuhaben, da TBT ohne Chlorid keine Bindung mit der c-Untereinheit eingeht (Mayer, 2014). Eine Tributylzinn-Seitengruppe aus dem hier eingesetzten Hemmstoff TBT-Oxid könnte eine ähnliche Funktion ausüben wie das Chlorid und ebenfalls bei der Bindung abgespalten werden. So ließe sich die detektierte Hemmung mit TBT-Oxid erklären. Wenn also der Mechanismus der Hemmung an der archaeellen c-Untereinheit durch TBT-Oxid und TBT-Cl mit dem von DCCD vergleichbar ist, wäre auch hier eine pH-Abhängigkeit zu erwarten. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint dies der Fall zu sein, obgleich der Effekt weniger deutlich ausgeprägt ist als bei DCCD. Detailliertere Informationen über den Wirkort könnten, wie in Pogoryelov et al., 2010, über eine Kristallstruktur eines mit TBT-Cl oder TBT-Oxid markierten archaeellen c-Rings erhalten werden.

Der Hemmstoff DES, ein synthetisches Östrogen, geht vermutlich eine feste Bindung mit dem  $A_1$ -Subkomplex ein und bewirkt so eine Hemmung der ATPase-Aktivität, auch wenn die Subkomplexe dissoziiert vorliegen (Lemker et al., 2001). Diese Reaktion zeigt keine pH-Abhängigkeit in dem in dieser Arbeit getesteten Bereich.

Nach diesen Ergebnissen zur Wirksamkeit der Hemmstoffe erscheint es sinnvoll, unabhängig von pH-Wert und Puffersystem der Membranpräparation, Aktivitäts- und Hemmstofftests im Tris-Puffersystem bei pH 8,0 durchzuführen, für welches sie etabliert wurden (Hlady, 2007). Die beschriebenen Experimente zur pH-Abhängigkeit der Hemmstoffe erfolgten jedoch nicht zu Beginn der Umstellung des Puffersystems, so dass zunächst bei pH 9,0 durchgeführte Hemmstofftests allein nicht aussagekräftig sind.

In der Anionenaustauschchromatographie bei pH 9,0 traten zwei Proteinpeaks mit ATP-Hydrolyseaktivität auf. Der erste wies große Ähnlichkeit mit dem Proteinpeak aus den Versuchen bei pH 8,0 auf und enthielt vor allem die Untereinheiten A, B, E und vermutlich F, wobei auch Untereinheiten aus dem  $A_0$ -Subkomplex nachgewiesen werden konnten. Im zweiten Proteinpeak dagegen scheint der Anteil der  $A_0$ -Subkomplexe deutlich höher zu sein. Mittels Western Blot und Peptidmassenfingerprinting konnten hier alle neun Untereinheiten

der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* nachgewiesen werden. Da jedoch der Antikörper gegen die Untereinheit F unspezifische Reaktionen zeigt, sollte die Präsenz selbiger mit anderen Methoden, beispielsweise über Peptidmassenfingerringdruck bzw. Massenspektrometrie, bestätigt werden. Dies war das erste Mal, dass sich nach einer Anionenaustauschchromatographie alle Untereinheiten in der gleichen Fraktion befanden, die zudem kaum Verunreinigungen enthielt. In vergleichbaren Arbeiten, die sich mit crenarchaeellen ATP-Synthasen/ATPasen befassten, konnten bislang lediglich Proteinkomplexe aus zwei bzw. drei Untereinheiten des Enzyms von *Sulfolobus acidocaldarius* (Lübben & Schäfer, 1987; Konishi et al., 1987), drei Untereinheiten von *Sulfolobus solfataricus* (Hochstein & Stan-Lotter, 1992) sowie sechs Untereinheiten von *Pyrodictium abyssi* (Dirmeier et al., 2000) gereinigt werden. Auch die bisherigen Reinigungsversuche der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* mittels Anionenaustauschchromatographie resultierten in einem Komplex aus lediglich vier Untereinheiten (A, B, E und F; Küper, 2010). Der höhere pH-Wert hat somit, wie vermutet, einen positiven Einfluss auf die Stabilität des Enzyms.

Trotz des stabilisierenden Einflusses des alkalischen pH-Wertes auf die ATP-Synthase/ATPase war diese offenbar nicht stabil genug für elektronenmikroskopische Strukturbestimmungen oder Kristallisationsexperimente (mündliche Mitteilung von Dr. Guohong Peng, Frankfurt/Main).

Aus diesem Grund wurde das Verfahren der Proteinfällung durch lineare Polymere wie Polyethylenglykol (PEG) als Alternative zur chromatographischen Reinigung getestet. Obwohl ATP-Synthasen/ATPasen bislang meist chromatographisch gereinigt wurden (u.a. Dirmeier et al., 2000; Lingl et al., 2003; Vonck et al., 2009; Mayer, 2014), stellt die Proteinfällung eine sehr schonende Methode zur Reinigung dar, die bereits erfolgreich auf große Proteinkomplexe angewendet wurde (mündliche Mitteilung von Prof. Dr. Holger Stark, Göttingen; Müller et al., 2009). Auch bei der Reinigung von ATP-Synthase/ATPase-Komplexen fand diese Methode schon Anwendung. In Pisa, 2008 wurden zunächst Proteinkontaminanten mit 4,1 % PEG 6000 entfernt, bevor die ATP-Synthase/ATPase von *P. furiosus* mit 12,9 % PEG 6000 gefällt wurde. In vielen Protokollen zur Reinigung von ATP-Synthasen/ATPasen wurde PEG jedoch lediglich zur Fällung von Proteinkontaminanten und nicht des Zielmoleküls eingesetzt (Vonck et al., 2009; Mayer et al., 2012b).

Der Mechanismus der PEG-Fällung ist nicht bis ins Detail geklärt. Man geht davon aus, dass PEG mit steigender Konzentration mehr und mehr Raum im Lösungsmittel einnimmt und somit den Proteinen Wasser entzogen wird, bis ihre Löslichkeit überschritten ist und sie ausfallen (Atha & Ingham, 1981).

Die ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* bzw. deren  $A_1$ -Subkomplex war bei PEG-Konzentrationen zwischen 4 und 12,5 % nachweisbar und zeigte nach der Fällung noch enzymatische Aktivität. Jedoch waren in den Fällungsfractionen mit gekoppelter ATP-



Synthase/ATPase auch massive Verunreinigungen, u.a. durch die Hydrogenase und das Thermosom enthalten. Als Thermosome werden Chaperonine der Gruppe II bei Archaeen bezeichnet (Klumpp & Baumeister, 1998). Sie werden bei erhöhter Inkubationstemperatur und nach Hitzeschock verstärkt exprimiert und tragen zur Thermotoleranz bei (Trent et al., 1990). Zum einen verhindern sie die Aggregation von Proteinen in der Zelle und zum anderen binden und falten sie Polypeptide unter Verbrauch von Energie (Trent, 1996; Klumpp & Baumeister, 1998). Das Thermosom von *I. hospitalis* weist eine typische Doppelringstruktur aus zwei Oktameren mit einer Masse von insgesamt etwa 1000 kDa auf. Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass es aus zwei zueinander homologen Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) besteht, die zu einem Heterooktamer zusammengelagert sind (Burghardt, 2005; Mayer, 2008). Eine der Untereinheiten wurde als Igni\_0897 identifiziert (Mayer, 2008), während es sich bei der zweiten wohl um das Protein Igni\_0096 handelt, welches ebenfalls als Thermosom annotiert ist (Burghardt et al., 2008; Tab. D.1). Es wurde bereits vermutet, dass das Thermosom bei *I. hospitalis* unter anderem membranassoziiert vorliegt (Mayer, 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestärken diese Vermutung, da die Thermosom-Bande bei ca. 1000 kDa im Nativgel fast ausschließlich in Membranpräparationen zu sehen war. Für *Pyrodictium occultum* konnte gezeigt werden, dass das Thermosom bei reduzierter Wachstumstemperatur in deutlich geringerem Maße exprimiert wird (Phipps et al., 1991). Aus diesem Grund wurde *I. hospitalis* für die Fällungsversuche bei 75°C statt bei 90°C gezüchtet, was knapp über seiner minimalen Wachstumstemperatur liegt (Paper et al., 2007). Jedoch konnte dadurch die Verunreinigung durch das Thermosom nicht signifikant reduziert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass das Thermosom bei *I. hospitalis*, ähnlich wie bei *Methanopyrus kandleri* (Andrä et al., 1996), wohl temperaturunabhängig und konstitutiv exprimiert wird.

Das verwendete PEG mit einer mittleren molekularen Masse von 6000 wurde ursprünglich als gut geeignet für Fällungsreaktionen beschrieben (Polson et al., 1964). Jedoch wurde beobachtet, dass zum einen die Spezifität der Fällung mit sinkender Molekülmasse steigt (Hönig & Kula, 1976) und zum anderen die Fällungseigenschaften besser werden, je größer die Masse des verwendeten Polymers ist (Atha & Ingham, 1981). Dementsprechend müssten zur Optimierung der Fällung der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* PEGs mit unterschiedlichen Molekülmassen getestet werden. Insbesondere zur Erhöhung der Spezifität sollte versuchsweise PEG 400 eingesetzt werden. Auch der pH-Wert und die Ionenstärke des verwendeten Puffers sowie die Temperatur beeinflussen die Fällung (Juckes, 1971), so dass auch dahingehend Versuche zur Optimierung durchgeführt werden sollten. Dabei ist es wichtig, auch jeweils den Kopplungsstatus und die Stabilität des Enzyms zu überprüfen.

Wenn so die übrigen Kontaminanten entfernt werden können und es gelingt, den Gesamtkomplex der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* erfolgreich und schonend zu

reinigen, sollten zunächst Versuche zur Charakterisierung des Enzyms durchgeführt werden. Insbesondere sollten das Temperatur- und pH-Optimum sowie die Substratspezifität bestimmt werden. Auch die Fähigkeit zur ATP-Synthese wurde an gereinigten Enzymen von *I. hospitalis* noch nicht gezeigt. Solche Tests wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da nicht sichergestellt werden konnte, dass die ATP-Synthase/ATPase über den gesamten Versuchsverlauf tatsächlich als gekoppelter Komplex vorlag.

Des Weiteren sollten mit einer gereinigten ATP-Synthase/ATPase auch die Versuche zur Stabilisierung wiederholt und optimiert werden. Die mit dem chromatographisch gereinigten Enzym durchgeführten Experimente ließen nicht auf einen gekoppelten Gesamtkomplex schließen. Möglicherweise war das Enzym durch den Säulenlauf so stark in Mitleidenschaft gezogen, dass es nicht mehr seine native Struktur aufwies und somit die Subkomplexe auch durch Crosslinker nicht mehr aneinander gekoppelt werden konnten. Zur Optimierung der GraFix-Methode sollte insbesondere die eingesetzte Proteinmenge variiert werden, um eine Vernetzung zu hochmolekularen Aggregaten zu vermeiden. Außerdem können statt einem Saccharosegradienten ein Glyceringradient oder andere (Zucker-) Gradienten eingesetzt werden (Stark, 2010). Auch könnten verschiedene Crosslinker getestet werden, deren Angriff nicht wie bei Glutaraldehyd und Formaldehyd an der primären Aminogruppe, sondern beispielsweise an einer Carboxyl- oder Sulfhydrylgruppe erfolgt (z.B. Carbodiimide oder Pyridyl-Disulfide). Glutaraldehyd ist jedoch bereits für diese Methode erprobt (Stark, 2010) und Formaldehyd bietet den Vorteil, dass die Vernetzung durch Hitzebehandlung rückgängig gemacht werden kann (Qin & Wang, 2009; Evers et al., 2011). Die ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* ist hitzestabil bis mindestens 110°C (Hlady, 2007), so dass nach einer Hitzebehandlung die Untereinheitenzusammensetzung des vernetzten Komplexes analysiert werden könnte.

Eine Methode nicht nur zur Bestimmung der einzelnen Untereinheiten, sondern auch ihrer Stöchiometrie ist die LILBID-MS (laser induced liquid bead ion desorption mass spectrometry), die auch mit Proteinkomplexen aus Nativgelen durchgeführt werden kann (Sokolova et al., 2010). Die beiden Subkomplexe der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* wurden bereits im Nativgel nachgewiesen. Werden diese Komplexe aus dem Gel extrahiert, können mittels LILBID-MS die genaue Untereinheitenzusammensetzung sowie deren Stöchiometrie bestimmt werden. Derartige Versuche sind im Verlauf dieser Arbeit nicht durchgeführt worden, da das entsprechende Gerät für die LILBID-MS nicht zur Verfügung stand. Für eine abschließende Charakterisierung des ATP-Synthase/ATPase-Komplexes ist eine solche Untersuchung jedoch unumgänglich.

Auch die Stöchiometrie des c-Rings allein könnte so ermittelt werden. Die c-Untereinheiten von archaeellen ATP-Synthasen/ATPasen können, wie eingangs erwähnt, in verschiedenen Variationen auftreten, insbesondere hinsichtlich der Anzahl der Transmembranhelices sowie der Anzahl und Art der Ionenbindestellen. Daraus ergeben sich c-Ringe unterschiedlicher

Größe und mit unterschiedlichen Stöchiometrien (Müller, 2004). Bei der F-Typ ATP-Synthase/ATPase von *I. tartaricus* besteht der c-Ring aus elf Untereinheiten (Vonck et al., 2002; Meier, 2005; Hakulinen et al., 2012), während er beispielsweise bei Spinatchloroplasten aus 14 Monomeren aufgebaut ist (Balakrishna et al., 2014). Bei A-Typ ATP-Synthasen/ATPasen wurden Stöchiometrien von  $c_{10}$  für *P. furiosus* und *E. hirae* (Vonck et al., 2009; Murata et al., 2005) oder auch  $c_{12}$  für *T. thermophilus* (Toei et al., 2007) gefunden.

Die c-Untereinheit von *I. hospitalis* wurde im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Es wurde bereits das Vorhandensein eines Signalpeptides prognostiziert (Küper, 2010). Durch Chloroform/Methanol-Extraktion und N-terminale Sequenzierung des isolierten Proteins konnte dies bewiesen werden. Die c-Untereinheit besitzt demnach ein Sec-spezifisches Signalpeptid mit einer positiv geladenen, aminoterminalen n-Region, einer hydrophoben h-Region und einer polaren, carboxyterminalen c-Region von insgesamt 31 Aminosäuren Länge, wenn man davon ausgeht, dass der annotierte Genstart dem tatsächlichen entspricht. Dies wird derzeit durch RNA-Analysen von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Ruth Schmitz-Streit (Universität Kiel) untersucht.

Man kann also davon ausgehen, dass in der fertigen c-Untereinheit das Signalpeptid abgespalten wurde und das Protein zwei Transmembranhelices besitzt. Dies konnte bereits für die c-Untereinheit der  $F_1F_0$  ATP-Synthase/ATPase von *Aquifex aeolicus*, einem hyperthermophilen Bakterium, gezeigt werden (Zhang et al., 2013). Auch von der c-Untereinheit von *S. acidocaldarius*, einem Vertreter der *Crenarchaeota*, wurde vermutet, dass sie eine Signalsequenz besitzt (Denda et al., 1989). Bisher konnte dies jedoch nicht bewiesen werden. Anhand von ausführlichen bioinformatischen und biochemischen Untersuchungen an verschiedenen Vertretern der *Eury*-, *Nano*-, *Cren*-, *Thaum*- und *Korarchaeota* konnte kürzlich erstmals gezeigt werden, dass die c-Untereinheiten der ATP-Synthasen/ATPasen der *Cren*-, *Thaum*- und *Korarchaeota* ein Signalpeptid besitzen, während dieses bei den *Eury*- und *Nanoarchaeota* fehlt (Mayer, 2014). Damit wird deutlich, dass sich in den verschiedenen Phyla unterschiedliche Mechanismen zur Membraninsertion der c-Untereinheit entwickelt haben.

Für das Bakterium *A. aeolicus* wird angenommen, dass die Erkennung der Signalsequenz über das Signal Recognition Particle (SRP) erfolgt. Anschließend wird die c-Untereinheit über YidC oder SecYEG in die Membran integriert (Zhang et al., 2013). Untersuchungen haben gezeigt, dass die YidC-Insertase bei Crenarchaeoten nicht vorkommt (Pohlschröder et al., 2005; Zhang et al., 2009) und auch im Genom von *I. hospitalis* wurde YidC nicht gefunden (Podar et al., 2008). Deshalb läuft die Membraninsertion der c-Untereinheit hier vermutlich über den Sec-Pathway oder einen anderen, noch unbekannten Weg. Der Sec-Weg ist ein universell konservierter Weg zur Sekretion von Proteinen oder deren Integration in die Membran (Szabo & Pohlschröder, 2012; Natale et al., 2008). Proteine, die über den Sec-Pathway zur Membran dirigiert werden, benötigen ein Sec-spezifisches Signalpeptid,

welches vom SRP oder dem Chaperon SecB erkannt wird (Natale et al., 2008). Da bei Bakterien der Weg der Membranintegration von Proteinen üblicherweise über das SRP und nicht über SecB läuft, wäre es denkbar, dass dies bei *I. hospitalis* auch der Fall ist. Während der Translation erkennt das SRP die Signalsequenz und der gesamte ribosomale Komplex wird zur Sec-Translocase dirigiert. Diese besteht aus einem Kanal (SecYE $\beta$  in Archaea) und einer ATPase (SecA), die, zusammen mit der protonenmotorischen Kraft, Energie für den aktiven Transport des Proteins in den bzw. durch den Kanal zur Verfügung stellt. Während oder kurz nach der Translokation wird das Signalpeptid durch die Signalpeptidase abgespalten (Natale et al., 2008). Bei *I. hospitalis* wurde Sec61 $\beta$ , eine Untereinheit des SecYE $\beta$ -Komplexes, in der inneren sowie in bestimmten Bereichen der äußeren Zellmembran lokalisiert (Heimerl, 2014). In der inneren Membran (IM) ist sowohl die Funktion der Sekretion von löslichen Proteinen ins IMC als auch eine Integration von Membranproteinen in die IM denkbar, während die Funktion in der äußeren Zellmembran unklar ist, da im IMC keine Ribosomen vorhanden sind und somit keine Translation stattfindet (Küper et al., 2010). Die ATP-Synthase/ATPase wird bei *I. hospitalis* vermutlich zunächst in die IM integriert. Darauf deuten vereinzelte Markierungen der IM mit Antikörpern gegen die ATP-Synthase/ATPase an Ultradünnschnitten hin (Flechsler, 2010; Küper et al., 2010). Darüber hinaus wurden in tomografischen Analysen in der IM Moleküle gefunden, die möglicherweise die ATP-Synthase/ATPase darstellen (Mitteilung von Dr. Bertram Daum, Frankfurt/Main). Der weitere Transport erfolgt dann über Vesikel bzw. tubuläre Ausstülpungen der IM, an denen ebenfalls vereinzelte Immunmarkierungen detektiert wurden (Flechsler, 2010; Küper et al., 2010). So könnte die ATP-Synthase/ATPase schließlich an ihren Zielort, die äußere Zellmembran, gelangen.

## 4.2 Die ATP-Synthase/ATPase innerhalb der Gattung *Ignicoccus*

Wie eingangs erwähnt, ist über die beiden nahen Verwandten von *I. hospitalis*, *I. islandicus* und *I. pacificus*, nicht viel bekannt. In früheren Arbeiten wurde bereits festgestellt, dass sich die Proteinzusammensetzungen der äußeren Zellmembran sowie des Cytoplasmas bei den verschiedenen *Ignicoccus*-Spezies unterscheiden (Burghardt, 2005). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das Protein lhomp1 bei *I. hospitalis* vorkommt, während es bei den übrigen *Ignicoccus*-Spezies durch Immunmarkierungen nicht nachgewiesen werden konnte (Daxer, 2011). Aufgrund fehlender Genomdaten war es jedoch nahezu unmöglich, einzelne Proteine aus *I. islandicus* oder *I. pacificus* zu identifizieren. Mit der Sequenzierung und vorläufigen Annotierung der beiden Genome durch die Arbeitsgruppe von Dr. Mircea Podar (Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, USA) konnten hier deutliche Fortschritte erzielt werden. Die Daten wurden zur Auswertung der biochemischen Analysen freundlicherweise zur Verfügung

gestellt. Da es sich um eine vorläufige Annotierung handelt, die noch nicht veröffentlicht wurde, ist jedoch eine nachträgliche Änderung der im Anhang D angegebenen Gennummern möglich.

Eine frühere Arbeit, die sich mit dem Organismus MEX13A, einem weiteren Vertreter der Gattung *Ignicoccus*, beschäftigte, lieferte erste Hinweise, dass sich die ATP-Synthase/ATPase dieses Mikroorganismus von der aus *I. hospitalis* unterscheidet. Ein Western Blot mit Antikörpern gegen den A<sub>1</sub>-Subkomplex zeigte ein Signal des nativen Komplexes aus MEX13A, welches zwischen 440 und 669 kDa lag und damit eine deutlich höhere apparente molekulare Masse aufwies als das bei *I. hospitalis* mit 440 kDa (Lange, 2009). Diese Fragestellung sollte sowohl für *I. islandicus* als auch für *I. pacificus*, von denen größere Zellmassen zur Verfügung standen als von MEX13A, näher untersucht werden.

Aufgrund der physiologischen Gemeinsamkeiten mit *I. hospitalis* sowie basierend auf den Genomdaten (vgl. Tab. D.2 und Tab. D.3) kann davon ausgegangen werden, dass sowohl *I. islandicus* als auch *I. pacificus* eine vollständige und funktionsfähige ATP-Synthase besitzen. In keinem der beiden Organismen ist die Untereinheit H annotiert, die nach dem gängigen Modell Teil der peripheren Stiele ist. Diese war bei *I. hospitalis* zunächst auch unbekannt. Jedoch konnte in Präparationen der ATP-Synthase/ATPase ein geeigneter Kandidat identifiziert und mit bioinformatischen Methoden verifiziert werden (Röhl, 2010). Da eine BLAST-Suche in den Genomen von *I. islandicus* und *I. pacificus* weder auf Protein- noch auf DNA-Ebene erfolgreich war, ist davon auszugehen, dass die Untereinheit H selbst innerhalb der Gattung *Ignicoccus* sehr wenig konserviert ist. Gerade diese Untereinheit kann oftmals nicht durch Sequenzvergleiche identifiziert werden (Lewalter & Müller, 2006). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass bei künftigen Reinigungen der Enzyme geeignete Kandidaten für diese Untereinheit auftreten werden, deren Identität dann verifiziert werden muss.

Die Dichtegradientenzentrifugation während der Membranpräparation deutet darauf hin, dass bei *I. islandicus* und *I. pacificus* die innere und die äußere Zellmembran getrennt werden können (Ziegler, 2014; Weigl, 2013). Bei diesen Organismen wurden noch keine Lipidanalysen durchgeführt, die den Unterschied zu *I. hospitalis* erklären könnten. Üblicherweise geht man davon aus, dass Membranen mit hohem Proteinanteil eine höhere Dichte haben als solche mit wenig Protein (Kleinig & Sitte, 1999). Jedoch ist über den Proteingehalt der inneren Membran von *I. hospitalis* sowie über die Zusammensetzung beider Membranen bei *I. islandicus* und *I. pacificus* wenig bekannt. Obwohl bei letzteren das Protein lhomp1 nicht nachgewiesen werden konnte, deuten Gefrierätz-Analysen darauf hin, dass hier die äußere Zellmembran, ähnlich wie bei *I. hospitalis*, ebenfalls mit Proteinen dichtgepackt vorliegt (Wyschkony, 1998). Hierzu fehlen jedoch molekulare und biochemische Analysen. Aus diesem Grund kann über den tatsächlichen Proteingehalt der Membranen von *I. islandicus* und *I. pacificus* nur spekuliert werden, sowie ob die innere

Membran von *I. hospitalis* einen ähnlich hohen Proteinanteil hat wie die OCM mit lhomp1 sowie den primären und sekundären Ionenpumpen.

Auffällig ist, dass die  $A_1$ -Subkomplexe von *I. islandicus* und *I. pacificus* (wie auch von MEX13A) im Nativgel eine deutlich höhere apparente molekulare Masse zeigen als der Subkomplex von *I. hospitalis*. Die Untereinheitenzusammensetzung der einzelnen Komplexe unterschied sich kaum voneinander, und eine Analyse der Genomdaten ergab keine signifikanten Unterschiede in der Molekülmasse der einzelnen Untereinheiten, die einen Massenunterschied von über 100 kDa erklären könnten. Es wurde bereits spekuliert, ob eine außergewöhnliche Stöchiometrie der katalytischen Untereinheiten von  $A_4B_4$  die Ursache sein könnte (Ziegler, 2014; Weigl, 2013). Ein Beweis steht jedoch noch aus, da elektronenmikroskopische Untersuchungen kein Ergebnis lieferten und LILBID-Analysen zu dem Zeitpunkt nicht möglich waren. Darüber hinaus ist unklar, wie die Bioenergetik eines solchen Enzyms aussehen könnte.

Vielmehr deuten Analysen mittels Gelfiltration darauf hin, dass die Subkomplexe tatsächlich die gleichen Molekularmassen besitzen. Die Abweichungen im Nativgel beruhen somit wahrscheinlich auf Ladungsunterschieden. Dies könnte mit einer sog. Blue Native PAGE überprüft werden, bei der die Eigenladungen von Proteinen mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie Blue G überlagert werden (Schägger & Jagow, 1991). Dieser Farbstoff bindet an hydrophobe Oberflächen von Proteinen und verleiht diesen eine negative Nettoladung, so dass sie, unabhängig von ihrem isoelektrischen Punkt, zur Anode wandern. Da diese Methode jedoch häufig Aktivitätstests im Gel beeinträchtigt, wurde bislang lediglich die sog. Clear Native PAGE (CNE) durchgeführt. Diese gilt, wie bereits erwähnt, als die mildeste der bekannten Elektrophoresetechniken und als gut geeignet, um supramolekulare Komplexe zu isolieren (Chung et al., 2008). Nichtsdestotrotz zerfallen auch die ATP-Synthasen/ATPasen von *I. islandicus* und *I. pacificus* während der Elektrophorese in ihre Subkomplexe und sind demnach anscheinend ähnlich instabil wie das Enzym aus *I. hospitalis*.

In früheren Arbeiten war es zwar möglich, mit dem Antikörper gegen den  $A_1$ -Subkomplex von *I. hospitalis* Immunmarkierungen an ganzen Zellen von *I. islandicus*, *I. pacificus* und MEX13A durchzuführen (Daxer, 2011), an Ultradünnschnitten dagegen waren die Ergebnisse bislang weniger schlüssig. Während hier bei *I. islandicus* eine mehr oder weniger gleichmäßige, wenngleich schwache Markierung der äußeren Zellmembran und des Cytoplasmas zu beobachten war, war bei *I. pacificus* und MEX13A nahezu keine Markierung erfolgt (Flechsler, 2010). Unter anderem aus diesem Grund wurde der gereinigte  $A_1$ -Subkomplex aus *I. pacificus* für die Generierung eines spezifischen Antikörpers eingesetzt. Western Blots mit dem erhaltenen Immunsereum zeigten zufriedenstellende Ergebnisse (Ziegler, 2014). Dennoch blieben erneute Markierungsversuche an Ultradünnschnitten erfolglos (Mitteilung von Jennifer Flechsler). Möglicherweise wird der Komplex während der

Reinigung strukturell so beeinflusst und verändert, dass die Epitope, gegen die die Antikörper gerichtet sind, im nativen Protein nicht zugänglich sind. Eine weitere mögliche Erklärung ist das Auftreten von verschiedenen Laborstämmen von *I. pacificus*. Der Antikörper wurde gegen den A<sub>1</sub>-Subkomplex des einen Stammes gewonnen, während die Markierungsversuche an Zellen eines anderen Stammes durchgeführt wurden, dessen ATP-Synthase/ATPase so verändert ist, dass die Antikörper nicht binden. Derartige Mutationen sind von verschiedenen, im Labor kultivierten Organismen bekannt. Beispielsweise gibt es einen Stamm von *Acidithiobacillus*, der nach wiederholten Überimpfungen vom Wildtyp abweichende Eigenschaften entwickelt hat und nicht mehr in der Lage ist, das S-Layer-Protein auszubilden (Klingl, 2011). Gegen diese Hypothese spricht jedoch die Tatsache, dass die Untereinheiten A und B, die einen Großteil des A<sub>1</sub>-Subkomplexes ausmachen, stark konserviert sind, da sie aus einem gemeinsamen Vorgänger entstanden sind und in unterschiedlichen Organismen die gleichen Funktionen ausüben (Müller & Grüber, 2003). Zwischen *I. pacificus* und *I. hospitalis* besteht beispielsweise bei der Untereinheit A eine Ähnlichkeit von 90 %, bei der Untereinheit B sogar von 94 %. Auch zwischen den Untereinheiten A und B von *I. islandicus* und *I. hospitalis* gibt es sehr große Ähnlichkeiten. Weshalb Antikörper gegen den A<sub>1</sub>-Subkomplex von *I. hospitalis* dennoch an Ultradünnschnitten der übrigen *Ignicoccus*-Spezies keine oder nur geringe Reaktion zeigen, bleibt unklar. Nichtsdestotrotz sollte für zukünftige Versuche auch der A<sub>1</sub>-Subkomplex aus *I. islandicus* gereinigt werden. Mit spezifischen Antikörpern gegen diesen Komplex könnten durch Immunmarkierungsversuche weitergehende Aussagen ermöglicht werden.

### 4.3 Die ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans*

Nach der erstmaligen Beschreibung von *N. equitans* im Jahr 2002 (Huber et al., 2002) folgte kurz darauf die Sequenzierung des Genoms (Waters et al., 2003). Dies lieferte erste Hinweise auf die metabolischen Fähigkeiten von *N. equitans*. Hinsichtlich der Energiegewinnung konnten allein anhand der Genomdaten jedoch keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Im Genom von *N. equitans* sind fünf Untereinheiten einer archaellen ATP-Synthase/ATPase kodiert: Die beiden katalytischen Untereinheiten A und B, die Untereinheit D als Teil des zentralen Stiels sowie die beiden membranständigen Untereinheiten a und c, die für die Ionentranslokation verantwortlich sind (Waters et al., 2003). Dies sind gut konservierte Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase, wohingegen die Untereinheiten C und H bei verschiedenen Spezies große Unterschiede aufweisen und deshalb oftmals nicht durch BLAST-Suchen identifiziert werden können (Lewalter & Müller, 2006). Es wäre also möglich, dass die fehlenden Untereinheiten zwar im Genom von *N. equitans* vorhanden sind, aber aufgrund des geringen Grades der Konservierung bislang nicht gefunden wurden und als hypothetische Proteine annotiert sind. Ein vergleichbares Phänomen ist vom 16S rRNA-

Gen von *N. equitans* bekannt, welches selbst in bei anderen Organismen stark konservierten Bereichen ungewöhnliche Sequenzen aufweist (Huber et al., 2002).

In Übereinstimmung mit den Genomdaten wurden in Proteomanalysen des Organismensystems *I. hospitalis* – *N. equitans* lediglich die Untereinheiten A, B, D und a aus *N. equitans* gefunden. Das Fehlen der Untereinheit c in dieser Untersuchung, bei der Membranproteine generell unterrepräsentiert sind, ist vermutlich auf deren starke Hydrophobizität zurückzuführen (Giannone et al., 2011). Insofern könnte *N. equitans* also tatsächlich lediglich eine rudimentäre ATP-Synthase/ATPase besitzen.

In dieser Arbeit war es erstmals möglich, die Untereinheit c als kleines, hydrophobes Protein nach Chloroform/Methanol-Extraktion nachzuweisen und durch Verdau mit Trypsin bzw. Chymotrypsin zu identifizieren. Bei *N. equitans* weist die c-Untereinheit eine klassische Struktur mit zwei Transmembranhelices auf (vgl. Tab. D.4). Es wird zwar eine Signalsequenz vorhergesagt, jedoch wird diese nicht abgespalten, wie massenspektrometrische Analysen vermuten lassen (Mayer, 2014), sondern bildet die erste Transmembranhelix. Ein eindeutiger Nachweis durch N-terminale Sequenzierung ist derzeit nicht möglich, da dieses Verfahren an der Universität Regensburg nicht mehr durchgeführt wird. Reine Vorhersagealgorithmen können oft nicht zwischen einer Signalsequenz und einer N-terminalen Transmembrandomäne unterscheiden (Natale et al., 2008). Es wäre denkbar, dass die erste Transmembranhelix zusätzlich die Funktion eines Signalpeptides übernimmt. Sie besitzt die typischen Merkmale einer Sec-spezifischen Signalsequenz mit einer n-, h- und c-Region. Da das Genom von *N. equitans* nicht für ein Signal Recognition Particle kodiert (Waters et al., 2003), könnte die Signalsequenz durch das Chaperon SecB erkannt werden, welches das noch ungefaltete Protein dann zur membranintegrierten Translocase SecYE $\beta$  dirigiert (Natale et al., 2008). In diesem Fall müsste jedoch sicher gestellt sein, dass die Transmembranhelix nicht durch die Signalpeptidase von *N. equitans* (vermutlich NEQ432) abgespalten wird.

Mit dem Nachweis der c-Untereinheit kann also davon ausgegangen werden, dass zumindest die annotierten Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* in der Zelle vorhanden sind. Ein Komplex mit der Stöchiometrie A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>Dac<sub>10-12</sub> hätte eine Molekülmasse von 480 – 495 kDa. Auch wenn weitere Untereinheiten wie C, E und H im kompletten Enzym vorhanden sind, ist davon auszugehen, dass dieses eine geringere molekulare Masse aufweist als das von *I. hospitalis*, da insbesondere die Untereinheiten B und a von *N. equitans* deutlich kleiner sind (vgl. Anhang D). Die ATP-Synthasen/ATPasen der beiden Organismen müssten also anhand ihrer Größe unterscheidbar sein.

Aus diesem Grund konnte bei der Reinigung der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* mit Zellmassen der Mischkultur gearbeitet werden, die im Gegensatz zu reinen *N. equitans*-Zellen ausreichend zur Verfügung standen. Ein Problem bei der Reinigung war dennoch der geringe Anteil von *N. equitans*-Zellen an der Gesamtzellmasse, der zudem von Ernte zu Ernte



variierte. So waren zum Beispiel in Zellpellets der Mischkultur, von denen nach der Ernte freie *N. equitans*-Zellen abgetrennt worden waren, anteilmäßig dennoch mehr *N. equitans*-Zellen enthalten als in frisch kultivierten Zellpellets ohne Abtrennung. Deshalb konnten die Versuche nur mit älteren Zellchargen durchgeführt werden, die nach der Ernte dem Prozess aus Resuspendieren und Zentrifugieren ausgesetzt waren. Der Einfluss dieser Vorgänge auf die Integrität der Zellen und damit die Stabilität der ATP-Synthasen/ATPasen ist noch nicht ausreichend geklärt. Zumindest *I. hospitalis*-Zellen scheinen unter dieser harschen Behandlung zu leiden, und auch die ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* konnte nicht aus so behandelten Zellen gereinigt werden.

Solange es nicht möglich ist, die ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* zu isolieren und hinsichtlich ihrer Struktur und Funktionalität zu charakterisieren, kann auch keine endgültige Aussage darüber getroffen werden, inwieweit *N. equitans* möglicherweise zur selbstständigen Energiekonservierung befähigt ist. Es gibt dagegen mehrere Hinweise, dass *N. equitans* ATP von seinem Wirt *I. hospitalis* bezieht.

Zum einen kann die Lokalisation der ATP-Synthase/ATPase in der äußeren Zellmembran von *I. hospitalis* und die damit verbundene hohe ATP-Konzentration im IMC den Import erleichtern, da der Transport über nur mehr zwei Membranen erfolgen muss (Küper et al., 2010). Zum anderen haben neueste Studien gezeigt, dass die Expression der H<sub>2</sub>Schwefeloxidorreduktase und der ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* in Anwesenheit von *N. equitans* um den Faktor zwei hochreguliert ist (Giannone et al., 2014). Dies deutet auf einen erhöhten Energiebedarf hin, der durch die Versorgung von *N. equitans* mit ATP erklärt werden kann. Allerdings könnte dieser auch auf der vermehrten Biosyntheseleistung beruhen, die *I. hospitalis* aufbringen muss, um *N. equitans* mit Proteinen (Giannone et al., 2011; Heimerl, 2014), Aminosäuren (Jahn et al., 2008) und Lipiden (Jahn et al., 2004) zu versorgen.

Darüber hinaus konnte im Genom von *N. equitans* keine primäre Ionenpumpe identifiziert werden (Waters et al., 2003). Das Fehlen eines solchen Proteins bedeutet, dass kein Ionengradient über der Membran aufgebaut und somit eine ATP-Synthase nicht angetrieben werden kann. Sollte das Enzym von *N. equitans* also funktionsfähig sein, ist eine Nutzung als ATPase zur Energetisierung der Membran *in vivo* wahrscheinlicher. Dies ist beispielsweise bei *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose, der Fall. Da dieser Organismus keine primäre Ionenpumpe besitzt, wird angenommen, dass er seine Na<sup>+</sup>-abhängige ATP-Synthase/ATPase ausschließlich zur Generierung eines Natriumionengradienten nutzt und mit Hilfe von Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiportern eine protonenmotorische Kraft aufbaut, während er ATP von seinem Wirt bezieht (Dzioba et al., 2003). Die ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* ist vermutlich, wie die von *B. burgdorferi*, natriumionen-abhängig. Seine c-Untereinheit besitzt ein Na<sup>+</sup>-Bindemotiv (Küper, 2010; Grüber et al., 2014) und es konnte in dieser Arbeit

einmalig gezeigt werden, dass die ATP-Hydrolyseaktivität mit steigender NaCl-Konzentration zunimmt. Dieses Ergebnis war jedoch bislang nicht reproduzierbar.

Letztendlich gibt es zwar Hinweise, dass die ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* Hydrolyseaktivität besitzt, jedoch kann dies nur durch eine erfolgreiche Wiederholung der Experimente bestätigt werden.

Die ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* konnte in Präparationen der Cokultur, aus denen freie *N. equitans*-Zellen entfernt wurden, nicht nachgewiesen werden. Dies könnte daran liegen, dass das Enzym hier gar nicht präsent war. Aufgrund bisheriger Untersuchungen lässt sich die Hypothese formulieren, dass *N. equitans*, solange es seinem Wirt anheftet, keine ATP-Synthase/ATPase synthetisiert.

Es konnte mittlerweile wiederholt gezeigt werden, dass die Cytoplasmen von *I. hospitalis* und *N. equitans* in unmittelbarer Verbindung stehen können (Heimerl, 2014; Mitteilung von Dr. Bertram Daum, Frankfurt/Main). In diesem Fall ist eine Energetisierung der Cytoplasmamembran von *N. equitans* nicht notwendig, da kein aktiver Stofftransport über eine Membran erfolgen muss. Wenn die innere Membran von *I. hospitalis* eine Teilenergetisierung aufweist, wovon aufgrund des notwendigen Stoffaustausches zwischen Cytoplasma und IMC ausgegangen werden muss, könnte diese auf *N. equitans* übertragen werden. Dies erklärt, weshalb in der Lebend-Tot-Färbung mit BacLight *N. equitans*-Zellen die gleiche Färbung aufweisen wie die *I. hospitalis*-Zelle, der sie anheften (Jahn, 2003). In diesem Stadium könnte der c-Ring, möglicherweise gemeinsam mit der Untereinheit a, als Ionenkanal dienen. Dieser wurde aus Zellen der Mischkultur isoliert, von denen freie *N. equitans*-Zellen abgetrennt worden waren und auch in Präparationen von angereicherten *N. equitans*-Zellen nachgewiesen.

Löst sich *N. equitans* von seinem Wirt ab, was in der stationären Wachstumsphase häufig auftritt (Jahn, 2003), muss es entweder einen Vorrat an ATP mitnehmen oder selbst ein Membranpotential aufbauen. Die Gene für die Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase werden exprimiert und das Enzym mit dem in der Cytoplasmamembran vorhandenen c-Ring rekonstituiert. Hier kann es als Natriumionen-abhängige ATPase arbeiten und einen Na<sup>+</sup>-Gradienten aufbauen. Ob dieser direkt genutzt wird, wie es von dem pathogenen Bakterium *Treponema pallidum* vermutet wird (Häse et al., 2001), oder möglicherweise in einen Protonengradienten umgewandelt wird, bleibt offen. Fest steht jedoch aufgrund der Lebend-Tot-Färbungen, dass viele freie *N. equitans*-Zellen ein Membranpotential besitzen und somit potentiell lebensfähig sind (Jahn, 2003).

Aus diesem Grund konnten in den Proteomanalysen sämtliche Untereinheiten, bis auf die Untereinheit c, der ATP-Synthase/ATPase nachgewiesen werden. Diese wurden mit Zellen der stationären Wachstumsphase der Mischkultur sowie mit angereicherten freien *N. equitans*-Zellen durchgeführt (Giannone et al., 2011). Der einmalige Nachweis von Untereinheiten der nanoarchaeellen ATP-Synthase/ATPase in Burghardt, 2008 sowie die

einzigsten erfolgreichen Versuche zur  $\text{Na}^+$ -abhängigkeit der ATP-Hydrolyse wären demnach auf eine unvollständige Abtrennung freier *N. equitans*-Zellen zurückzuführen. Seitdem war es nicht nochmals möglich, Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* in Zellpräparationen ohne freie *N. equitans*-Zellen zu identifizieren. In Versuchen, für die diese nicht abgetrennt wurden, waren insgesamt zu wenig *N. equitans*-Zellen enthalten, um eine eindeutige Aussage über das Vorhandensein der ATP-Synthase/ATPase zu treffen.

Die geschilderte Hypothese könnte über (Cryo-)Tomografie sowie über Immunmarkierungsversuche gefestigt werden. *N. equitans*-Zellen sind klein genug, um tomografische Verfahren anzuwenden und auf diese Weise wurde bereits die Kontaktstelle zwischen *N. equitans* und *I. hospitalis* untersucht. In diesen Untersuchungen konnten jedoch noch keine Moleküle, welche potentiell ATP-Synthasen/ATPasen darstellen könnten, in der Cytoplasmamembran von *N. equitans* visualisiert werden, während dies bei *I. hospitalis* schon der Fall war (Mitteilung von Dr. Bertram Daum, Frankfurt/Main). Tomografische Untersuchungen von freien *N. equitans*-Zellen sollten Hinweise liefern können, ob die ATP-Synthase/ATPase hier vorhanden ist. In diesem Fall wäre allerdings eine Reinigung der ATP-Synthase/ATPase aufgrund der äußerst geringen Ausbeute freier *N. equitans*-Zellen über klassische proteinbiochemische Methoden nahezu unmöglich.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Proteinkomplex aus *I. hospitalis* chromatographisch gereinigt werden, der alle Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase enthielt. Jedoch erwies sich dieser als sehr instabil, was unter anderem während der nativen Gelelektrophorese und der Gelfiltration deutlich wurde. Er zerfiel dabei in zwei Subkomplexe von etwa 440 kDa und 669 kDa, von denen der erste die Untereinheiten A, B, E und vermutlich F und der zweite die Untereinheiten a, c, H sowie vermutlich C und D enthielt. Dies ist vergleichbar mit früheren Ergebnissen, die die gleiche Bruchstelle innerhalb der ATP-Synthase/ATPase vorhersagen. Aus diesem Grund konnten keine strukturellen Analysen mittels Elektronenmikroskopie oder Röntgenkristallographie durchgeführt werden.

Bei der Reinigung erwies sich ein pH-Wert von pH 9,0 als besser geeignet im Vergleich zu früheren Arbeiten, in denen bei pH 8,0 gearbeitet wurde. Dies spiegelt vermutlich die Verhältnisse im Intermembrankompartiment wider, denen die ATP-Synthase/ATPase *in vivo* ausgesetzt ist.

Durch Proteinfällung mit PEG 6000 konnte die gekoppelte ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis* angereichert werden, ohne die Aktivität oder die Stabilität des Enzyms zu beeinträchtigen. Aufgrund der Anwesenheit anderer Proteine, u.a. des Thermosoms und der Hydrogenase, in der Fällungsfraction konnten noch keine strukturellen Untersuchungen durchgeführt werden.

In der c-Untereinheit von *I. hospitalis* wurde eine Signalsequenz identifiziert, die während der Reifung des Proteins abgespalten wird. Damit können nun konkretere Hypothesen darüber geäußert werden, wie der Transport in die OCM erfolgt.

Die ATP-Synthasen/ATPasen von *I. pacificus* und *I. islandicus* weisen vermutlich eine sehr ähnliche Struktur auf wie das Enzym von *I. hospitalis*, obwohl die A<sub>1</sub>-Subkomplexe im Nativgel ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen. Immunmarkierungsversuche mit Antikörpern gegen diesen Komplex von *I. pacificus* blieben bislang erfolglos. Die Diskrepanz zwischen der hohen Sequenzidentität der einzelnen Untereinheiten und der schlechten Kreuzreaktion der Antikörper bleibt unklar.

Die ATP-Synthase/ATPase von *N. equitans* konnte nicht aus Zellextrakten der Mischkultur, von denen freie *N. equitans*-Zellen abgetrennt worden waren, gereinigt werden. Mit dem Nachweis der c-Untereinheit nach Chloroform/Methanol-Extraktion und dem einmaligen Nachweis von Na<sup>+</sup>-abhängiger Hydrolyseaktivität konnte jedoch die Vermutung bestärkt werden, dass das Enzym *in vivo* tatsächlich vorhanden ist. Es dient möglicherweise als ATPase zum Aufbau eines Ionengradienten in freien *N. equitans*-Zellen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Albers, S.V., van de Vossenberg, J.L., Driessen, A.J., und Konings, W.N. (2001).** Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles* 5, 285-294.
- Andrä, S., Frey, G., Nitsch, M., Baumeister, W., und Stetter, K.O. (1996).** Purification and structural characterization of the thermosome from the hyperthermophilic archaeum *Methanopyrus kandleri*. *FEBS Lett.* 379, 127-131.
- Arai, S., Saijo, S., Suzuki, K., Mizutani, K., Kakinuma, Y., Ishizuka-Katsura, Y., Ohsawa, N., Terada, T., Shirouzu, M., und Yokoyama, S., et al. (2013).** Rotation mechanism of *Enterococcus hirae*  $V_1$ -ATPase based on asymmetric crystal structures. *Nature* 493, 703-707.
- Atha, D.H., und Ingham, K.C. (1981).** Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *J. Biol. Chem.* 256, 12108-12117.
- Back, J.F., Oakenfull, D., und Smith, M.B. (1979).** Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* 18, 5191-5196.
- Balakrishna, A.M., Hunke, C., und Grüber, G. (2012).** The Structure of Subunit E of the *Pyrococcus horikoshii* OT3 A-ATP Synthase Gives Insight into the Elasticity of the Peripheral Stalk. *Journal of Molecular Biology* 420, 155-163.
- Balakrishna, A.M., Manimekalai, M.S.S., Hunke, C., Gayen, S., Rössle, M., Jeyakanthan, J., und Grüber, G. (2010).** Crystal and solution structure of the C-terminal part of the *Methanocaldococcus jannaschii*  $A_1A_0$  ATP synthase subunit E revealed by X-ray diffraction and small-angle X-ray scattering. *J Bioenerg Biomembr* 42, 311-320.
- Balakrishna, A.M., Seelert, H., Marx, S.-H., Dencher, N.A., und Grüber, G. (2014).** Crystallographic structure of the turbine c-ring from spinach chloroplast F-ATP synthase. *Biosci. Rep.*
- Ballmoos, C. von, Brunner, J., und Dimroth, P. (2004).** The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11239-11244.
- Ballmoos, C. von, und Dimroth, P. (2007).** Two Distinct Proton Binding Sites in the ATP Synthase Family. *Biochemistry* 46, 11800-11809.
- Ballmoos, C. von, Wiedenmann, A., und Dimroth, P. (2009).** Essentials for ATP Synthesis by  $F_1F_0$  ATP Synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 649-672.
- Blum, H., Beier, H., und Gross, H.J. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Boyer, P.D. (1993).** The binding change mechanism for ATP synthase — Some probabilities and possibilities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Bioenergetics* 1140, 215-250.
- Boyer, P.D. (1997).** The ATP Synthase—A Splendid Molecular Machine. *Annu. Rev. Biochem.*, 717-749.
- Burghardt, T. (2005).** Isolation und Charakterisierung der Proteine der äußeren Membran von *Ignicoccus* sp. KIN4I. Diplomarbeit (Regensburg).
- Burghardt, T. (2008).** Einblicke in die Interaktion zwischen *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*: Das Membranprotein Ihomp1 sowie Nachweis weiterer Proteine der Zellhüllen. Dissertation (Regensburg).

- Burghardt, T., Junglas, B., Siedler, F., Wirth, R., Huber, H., und Rachel, R. (2009).** The interaction of *Nanoarchaeum equitans* with *Ignicoccus hospitalis*: proteins in the contact site between two cells. *Biochem. Soc. Trans* 37, 127.
- Burghardt, T., Näther, D.J., Junglas, B., Huber, H., und Rachel, R. (2007).** The dominating outer membrane protein of the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*: a novel pore-forming complex. *Mol Microbiol* 63, 166-176.
- Burghardt, T., Saller, M., Gürster, S., Müller, D., Meyer, C., Jahn, U., Hochmuth, E., Deutzmann, R., Siedler, F., und Babinger, P., et al. (2008).** Insight into the proteome of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*: the major cytosolic and membrane proteins. *Arch Microbiol* 190, 379-394.
- Capaldi, R.A., und Aggeler, R. (2002).** Mechanism of the  $F_1F_0$ -type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 154-160.
- Chung, M., Jordan, B., Wittig, I., und Schägger, H. (2008).** Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics* 8, 3974-3990.
- Cipriano, D.J., Wang, Y., Bond, S., Hinton, A., Jefferies, K.C., Qi, J., und Forgac, M. (2008).** Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Bioenergetics* 1777, 599-604.
- Coskun, U., Grüber, G., Koch, M.H.J., Godovac-Zimmermann, J., Lemker, T., und Müller, V. (2002).** Cross-talk in the  $A_1$ -ATPase from *Methanosarcina mazei* Gö1 due to nucleotide binding. *J. Biol. Chem.* 277, 17327-17333.
- Coskun, U., Radermacher, M., Muller, V., Ruiz, T., und Gruber, G. (2004).** Three-dimensional Organization of the Archaeal  $A_1$ -ATPase from *Methanosarcina mazei* Gö1. *Journal of Biological Chemistry* 279, 22759-22764.
- Daxer, S. (2011).** Lokalisation stoffwechselrelevanter Enzymkomplexe sowie Anreicherung einer membrangebundenen Pyrophosphatase in Vertretern der archaeellen Gattung *Ignicoccus*. Masterarbeit (Regensburg).
- Denda, K., Konishi, J., Oshima, T., Date, T., und Yoshida, M. (1989).** A gene encoding the proteolipid subunit of *Sulfolobus acidocaldarius* ATPase complex. *J. Biol. Chem.* 264, 7119-7121.
- Dimroth, P., und Ballmoos, C. von (2008).** ATP synthesis by decarboxylation phosphorylation. *Results Probl Cell Differ* 45, 153-184.
- Dirmeier, R. (1998).** Untersuchungen membrangebundener Enzymkomplexe zur lithotropen Energiegewinnung durch Schwefelatmung aus *Pyrodictium abyssi* Isolat TAG11. Dissertation (Regensburg).
- Dirmeier, R., Hauska, G., und Stetter, K.O. (2000).** ATP synthesis at 100 degrees C by an ATPase purified from the hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi*. *FEBS Lett.* 467, 101-104.
- Dzioba, J., Häse, C.C., Gosink, K., Galperin, M.Y., und Dibrov, P. (2003).** Experimental Verification of a Sequence-Based Prediction:  $F_1F_0$ -Type ATPase of *Vibrio hermopolis* Transports Protons, Not  $Na^+$  Ions. *Journal of Bacteriology* 185, 674-678.
- Edman, P. (1970).** Sequence determination. *Mol Biol Biochem Biophys* 8, 211-255.
- Evers, D.L., Fowler, C.B., Cunningham, B.R., Mason, J.T., und O'Leary, T.J. (2011).** The Effect of Formaldehyde Fixation on RNA. *The Journal of Molecular Diagnostics* 13, 282-288.
- Fillingame, R.H. (1976).** Purification of the carbodiimide-reactive protein component of the ATP energy-transducing system of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 251, 6630-6637.

- Flechsler, J. (2010).** Immunlokalisation von Proteinkomplexen und Enzymen an Isolaten der hyperthermophilen Archaeen der Gattung *Ignicoccus*. Diplomarbeit (Regensburg).
- Forth, M. (2010).** Aufreinigung und Charakterisierung des Hydrogenase Schwefelreduktase Komplexes aus *Ignicoccus hospitalis*. Diplomarbeit (Darmstadt).
- Gayen, S., und Grüber, G. (2010).** Disulfide linkage in the coiled-coil domain of subunit H of A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATP synthase from *Methanocaldococcus jannaschii* and the NMR structure of the C-terminal segment H85–104. *FEBS Letters* 584, 713-718.
- GE Healthcare (2010).** Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing. Principles and Methods (Uppsala, Schweden).
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C.R., Meagher, D.A., Imai, B.S., und Mische, S.M. (1999).** Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20, 601-605.
- Giannone, R.J., Huber, H., Karpinets, T., Heimerl, T., Küper, U., Rachel, R., Keller, M., Hettich, R.L., Podar, M., und Randau, L. (2011).** Proteomic Characterization of Cellular and Molecular Processes that Enable the *Nanoarchaeum equitans*-*Ignicoccus hospitalis* Relationship. *PLoS ONE* 6, e22942.
- Giannone, R.J., Wurch, L.L., Heimerl, T., Martin, S., Yang, Z., Huber, H., Rachel, R., Hettich, R.L., und Podar, M. (2014).** Life on the edge: functional genomic response of *Ignicoccus hospitalis* to the presence of *Nanoarchaeum equitans*. *ISME J.* (Epub ahead of print).
- Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S., und Singh, R.M. (1966).** Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5, 467-477.
- Grüber, G., Manimekalai, M.S.S., Mayer, F., und Müller, V. (2014).** ATP synthases from archaea: the beauty of a molecular motor. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 940-952.
- Grüber, G., Svergun, D.I., Coskun, Ü., Lemker, T., Koch, M.H.J., Schägger, H., und Müller, V. (2001a).** Structural Insights into the A<sub>1</sub> ATPase from the Archaeon, *Methanosarcina mazei* Gö1. *Biochemistry* 40, 1890-1896.
- Grüber, G., Wiczorek, H., Harvey, W.R., und Müller, V. (2001b).** Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J. Exp. Biol.* 204, 2597-2605.
- Gürster, S. (2007).** *Nanoarchaeum equitans*: Versuche zur Reindarstellung und strukturellen und proteinbiochemischen Charakterisierung. Diplomarbeit (Regensburg).
- Hakulinen, J.K., Klyszejko, A.L., Hoffmann, J., Eckhardt-Strelau, L., Brutschy, B., Vonck, J., und Meier, T. (2012).** Structural study on the architecture of the bacterial ATP synthase F<sub>0</sub> motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E2050.
- Häse, C.C., Fedorova, N.D., Galperin, M.Y., und Dibrov, P.A. (2001).** Sodium Ion Cycle in Bacterial Pathogens: Evidence from Cross-Genome Comparisons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 353-370.
- Heimerl, T. (2014).** *Ignicoccus* und *Nanoarchaeum*: 3D-Struktur und Proteom. Dissertation (Regensburg).
- Heinonen, J.K., und Lahti, R.J. (1981).** A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analytical Biochemistry* 113, 313-317.
- Hilario, E., und Gogarten, J.P. (1993).** Horizontal transfer of ATPase genes — the tree of life becomes a net of life. *Biosystems* 31, 111-119.
- Hlady, J. (2007).** ATP-Hydrolyse und biochemische Charakterisierung der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATP-Synthase/ATPase von *Ignicoccus hospitalis*. Diplomarbeit (Regensburg).

- Hochstein, L.I., und Stan-Lotter, H. (1992).** Purification and properties of an ATPase from *Sulfolobus solfataricus*. Arch. Biochem. Biophys. 295, 153-160.
- Hohn, M.J., Hedlund, B.P., und Huber, H. (2002).** Detection of 16S rDNA sequences representing the novel phylum "*Nanoarchaeota*": indication for a wide distribution in high temperature biotopes. Syst. Appl. Microbiol. 25, 551-554.
- Hönig, W., und Kula, M.R. (1976).** Selectivity of protein precipitation with polyethylene glycol fractions of various molecular weights. Anal. Biochem. 72, 502-512.
- Huber, H., Burggraf, S., Mayer, T., Wyschkony, I., Rachel, R., und Stetter, K.O. (2000).** *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp nov and *Ignicoccus pacificus* sp nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50 Pt 6, 2093-2100.
- Huber, H., Gallenberger, M., Jahn, U., Eylert, E., Berg, I.A., Kockelkorn, D., Eisenreich, W., und Fuchs, G. (2008).** A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 7851-7856.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C., und Stetter, K.O. (2002).** A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. Nature 417, 63-67.
- Huber, H., Küper, U., Daxer, S., und Rachel, R. (2012).** The unusual cell biology of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*. Antonie van Leeuwenhoek 102, 203-219.
- Inatomi, K. (1986).** Characterization and purification of the membrane-bound ATPase of the archaebacterium *Methanosarcina barkeri*. J. Bacteriol. 167, 837-841.
- Jahn, U. (2003).** Physiologische, molekularbiologische und biochemische Untersuchungen am Organismensystem *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus* sp. Kin4/I. Diplomarbeit (Regensburg).
- Jahn, U., Gallenberger, M., Paper, W., Junglas, B., Eisenreich, W., Stetter, K.O., Rachel, R., und Huber, H. (2008).** *Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: New Insights into a Unique, Intimate Association of Two Archaea. Journal of Bacteriology 190, 1743-1750.
- Jahn, U., Huber, H., Eisenreich, W., Hugler, M., und Fuchs, G. (2007).** Insights into the Autotrophic CO<sub>2</sub> Fixation Pathway of the Archaeon *Ignicoccus hospitalis*: Comprehensive Analysis of the Central Carbon Metabolism. Journal of Bacteriology 189, 4108-4119.
- Jahn, U., Summons, R., Sturt, H., Grosjean, E., und Huber, H. (2004).** Composition of the lipids of *Nanoarchaeum equitans* and their origin from its host *Ignicoccus* sp. strain KIN4/I. Arch Microbiol 182, 404-413.
- Juckes, I.R. (1971).** Fractionation of proteins and viruses with polyethylene glycol. Biochim. Biophys. Acta 229, 535-546.
- Junglas, B., Briegel, A., Burghardt, T., Walther, P., Wirth, R., Huber, H., und Rachel, R. (2008).** *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*: ultrastructure, cell-cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography. Arch Microbiol 190, 395-408.
- Kane, P.M., und Smardon, A.M. (2003).** Assembly and regulation of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. J. Bioenerg. Biomembr. 35, 313-321.
- Kastner, B., Fischer, N., Golas, M.M., Sander, B., Dube, P., Boehringer, D., Hartmuth, K., Deckert, J., Hauer, F., und Wolf, E., et al. (2007).** GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. Nat Meth 5, 53-55.
- Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinosita, K., und Yoshida, M. (1998).** Direct observation of the rotation of epsilon subunit in F<sub>1</sub>-ATPase. J. Biol. Chem. 273, 19375-19377.



- Kish-Trier, E., Briere, L.-A.K., Dunn, S.D., und Wilkens, S. (2008).** The Stator Complex of the  $A_1A_0$ -ATP Synthase—Structural Characterization of the E and H Subunits. *Journal of Molecular Biology* 375, 673-685.
- Kish-Trier, E., und Wilkens, S. (2009).** Domain Architecture of the Stator Complex of the  $A_1A_0$ -ATP Synthase from *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of Biological Chemistry* 284, 12031-12040.
- Kleinig, H., und Sitte, P. (1999).** Zellbiologie (Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Fischer).
- Klingl, A. (2011).** Struktur und Funktion von S-Layern acidophiler Bakterien und Archaeen, ihre Rolle bei der Pyrit-Oxidation sowie die Adhäsion an Oberflächen. Dissertation (Regensburg).
- Klumpp, M., und Baumeister, W. (1998).** The thermosome: archetype of group II chaperonins. *FEBS Lett.* 430, 73-77.
- Konishi, J., Wakagi, T., Oshima, T., und Yoshida, M. (1987).** Purification and properties of the ATPase solubilized from membranes of an acidothermophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biochem.* 102, 1379-1387.
- Könneke, M., Schubert, D.M., Brown, P.C., Hugler, M., Standfest, S., Schwander, T., Schada von Borzyskowski, L., Erb, T.J., Stahl, D.A., und Berg, I.A. (2014).** Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO<sub>2</sub> fixation. *Proceedings hermo National Academy of Sciences* 111, 8239-8244.
- Kreuter, L. (2010).** Untersuchung energiekonservierender Enzymkomplexe innerhalb der archaeellen Gattung *Ignicoccus*. Diplomarbeit (Regensburg).
- Kumar, A., Manimekalai, M.S.S., Balakrishna, A.M., Priya, R., Biuković, G., Jeyakanthan, J., und Grüber, G. (2010).** The critical roles of residues P235 and F236 of subunit A of the motor protein A-ATP synthase in P-loop formation and nucleotide binding. *J. Mol. Biol.* 401, 892-905.
- Küper, U. (2010).** Untersuchungen zur Energiegewinnung des hyperthermophilen, schwefelreduzierenden Archaeons *Ignicoccus hospitalis*. Dissertation (Regensburg).
- Küper, U., Meyer, C., Müller, V., Rachel, R., und Huber, H. (2010).** Energized outer membrane and spatial separation of metabolic processes in the hyperthermophilic Archaeon *Ignicoccus hospitalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 3152-3156.
- Lämmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lange, M. (2009).** Neue Hochtemperatur-Organismen von Lesbos und dem Ostpazifischen-Rücken. Diplomarbeit (Regensburg).
- Lau, W.C.Y., und Rubinstein, J.L. (2011).** Subnanometre-resolution structure of the intact *Thermus hermophilus* H<sup>+</sup>-driven ATP synthase. *Nature* 481, 214-218.
- Lemker, T., Grüber, G., Schmid, R., und Müller, V. (2003).** Defined subcomplexes of the  $A_1$  ATPase from the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1: biochemical properties and redox regulation. *FEBS Lett.* 544, 206-209.
- Lemker, T., Ruppert, C., Stöger, H., Wimmers, S., und Müller, V. (2001).** Overproduction of a functional  $A_1$  ATPase from the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 268, 3744-3750.
- Lewalter, K., und Müller, V. (2006).** Bioenergetics of archaea: Ancient energy conserving mechanisms developed in the early history of life. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Bioenergetics* 1757, 437-445.

- Lingl, A., Huber, H., Stetter, K.O., Mayer, F., Kellermann, J., und Müller, V. (2003).** Isolation of a complete A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATP synthase comprising nine subunits from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Extremophiles* 7, 249-257.
- Lübben, M., und Schäfer, G. (1987).** A plasma-membrane associated ATPase from the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur J Biochem*, 533-540.
- Maegawa, Y., Morita, H., Iyaguchi, D., Yao, M., Watanabe, N., und Tanaka, I. (2006).** Structure of the catalytic nucleotide-binding subunit A of A-type ATP synthase from *Pyrococcus horikoshii* reveals a novel domain related to the peripheral stalk. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 483-488.
- Mayer, F. (2008).** Isolierung und biochemische Charakterisierung von Membran-assoziierten Proteinkomplexen des hyperthermophilen Archaeums *Ignicoccus hospitalis*. Diplomarbeit (Regensburg).
- Mayer, F. (2014).** Der Nanomotor archaeeiler ATP-Synthasen: Na<sup>+</sup>-Transport, Ionenspezifität und Membraninsertion. Dissertation (Frankfurt am Main).
- Mayer, F., Küper, U., Meyer, C., Daxer, S., Müller, V., Rachel, R., und Huber, H. (2012a).** AMP-Forming Acetyl Coenzyme A Synthetase in the Outermost Membrane of the Hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*. *Journal of Bacteriology* 194, 1572-1581.
- Mayer, F., Leone, V., Langer, J.D., Faraldo-Gómez, J.D., und Müller, V. (2012b).** A c subunit with four transmembrane helices and one ion (Na<sup>+</sup>)-binding site in an archaeal ATP synthase: implications for c ring function and structure. *J. Biol. Chem.* 287, 39327-39337.
- Mayer, F., und Müller, V. (2013).** Adaptations of anaerobic archaea to life under extreme energy limitation. *FEMS Microbiol Rev*, n/a.
- Meier, T. (2005).** Structure of the Rotor Ring of F-Type Na<sup>+</sup>-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science* 308, 659-662.
- Menzel, T. (2007).** Rekombinante Expression extrazellulärer Proteine der hyperthermophilen Archaea *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*. Diplomarbeit (Regensburg).
- Meyer, C. (2007).** Charakterisierung von Zellanhängen und extrazellulären Strukturen bei *Ignicoccus pacificus*. Diplomarbeit (Regensburg).
- Meyer, C. (2010).** Die Fibers von *Ignicoccus hospitalis*: Ultrastruktur, Verankerung und molekularbiologische Untersuchungen. Dissertation (Regensburg).
- Meyer, C., Heimerl, T., Wirth, R., Klingl, A., und Rachel, R. (2014).** The Iho670 fibers of *Ignicoccus hospitalis* are anchored in the cell by a spherical structure located beneath the inner membrane. *Journal of Bacteriology* 196, 3807-3815.
- Minagawa, Y., Ueno, H., Hara, M., Ishizuka-Katsura, Y., Ohsawa, N., Terada, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Yamato, I., und Muneyuki, E., et al. (2013).** Basic Properties of Rotary Dynamics of the Molecular Motor *Enterococcus hirae* V<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 288, 32700-32707.
- Müller, D.W., Meyer, C., Gürster, S., Küper, U., Huber, H., Rachel, R., Wanner, G., Wirth, R., und Bellack, A. (2009).** The Iho670 Fibers of *Ignicoccus hospitalis*: a New Type of Archaeal Cell Surface Appendage. *Journal of Bacteriology* 191, 6465-6468.
- Müller, V. (2004).** An Exceptional Variability in the Motor of Archaeal A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATPases: From Multimeric to Monomeric Rotors Comprising 6–13 Ion Binding Sites. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 36, 115-125.
- Müller, V., und Grüber, G. (2003).** ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 474-494.

- Müller, V., Lemker, T., Lingl, A., Weidner, C., Coskun, U., und Grüber, G. (2005a).** Bioenergetics of Archaea: ATP Synthesis under Harsh Environmental Conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* 10, 167-180.
- Müller, V., Lingl, A., Lewalter, K., und Fritz, M. (2005b).** ATP Synthases With Novel Rotor Subunits: New Insights into Structure, Function and Evolution of ATPases. *J Bioenerg Biomembr* 37, 455-460.
- Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Leslie, A.G.W., und Walker, J.E. (2005).** Structure of the rotor of the V-Type Na<sup>+</sup>-ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science* 308, 654-659.
- Nass, B., Poll, U., Langer, J., Kreuter, L., Kuper, U., Flechsler, J., Heimerl, T., Rachel, R., Harald, H., und Kletzin, A. (2014).** Three Multiheme Cytochromes c from the Hyperthermophilic Archaeon *Ignicoccus hospitalis*: Purification, Properties and Localization. *Microbiology*.
- Natale, P., Brüser, T., und Driessen, A.J.M. (2008).** Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1735-1756.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., und Kinosita, K. (1997).** Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* 386, 299-302.
- Pänke, O., Gumbiowski, K., Junge, W., und Engelbrecht, S. (2000).** F-ATPase: specific observation of the rotating c subunit oligomer of EfoEF1. *FEBS Letters* 472, 34-38.
- Paper, W., Jahn, U., Hohn, M.J., Kronner, M., Nather, D.J., Burghardt, T., Rachel, R., Stetter, K.O., und Huber, H. (2007).** *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of 'Nanoarchaeum equitans'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 803-808.
- Pertoft, H. (2000).** Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 44, 1-30.
- Phipps, B.M., Hoffmann, A., Stetter, K.O., und Baumeister, W. (1991).** A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic hermophilesal. *EMBO J.* 10, 1711-1722.
- Pisa, K.Y. (2008).** ATP-Synthasen aus Archäen: Reinigung und Charakterisierung der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATP-Synthase aus *Pyrococcus furiosus*. Dissertation (Frankfurt am Main).
- Podar, M., Anderson, I., Makarova, K.S., Elkins, J.G., Ivanova, N., Wall, M.A., Lykidis, A., Mavromatis, K., Sun, H., und Hudson, M.E., et al. (2008).** A genomic analysis of the archaeal system *Ignicoccus hospitalis*-*Nanoarchaeum equitans*. *Genome Biol* 9, R158.
- Podar, M., Makarova, K.S., Graham, D.E., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., und Reysenbach, A.-L. (2013).** Insights into archaeal evolution and symbiosis from the genomes of a nanoarchaeon and its inferred crenarchaeal host from Obsidian Pool, Yellowstone National Park. *Biol Direct* 8, 9.
- Pogoryelov, D., Krah, A., Langer, J.D., Yildiz, Ö., Faraldo-Gómez, J.D., und Meier, T. (2010).** Microscopic rotary mechanism of ion translocation in the F<sub>o</sub> complex of ATP synthases. *Nat Chem Biol* 6, 891-899.
- Pohlschröder, M., Hartmann, E., Hand, N.J., Dilks, K., und Haddad, A. (2005).** Diversity and evolution of protein translocation. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 91-111.
- Polson, A., Potgieter, G.M., Largier, J.F., Mears, G.E., und Joubert, F.J. (1964).** The Fractionation of Protein Mixtures by Linear Polymers of High Molecular Weight. *Biochim. Biophys. Acta* 82, 463-475.
- Qin, H., und Wang, Y. (2009).** Exploring DNA-binding proteins with in vivo chemical cross-linking and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 8, 1983-1991.
- Rachel, R., Wyschkony, I., Riehl, S., und Huber, H. (2002).** The ultrastructure of *Ignicoccus*: Evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea*, 9-18.

- Raghunathan, D., Gayen, S., Grüber, G., und Verma, C.S. (2010).** Crosstalk along the Stalk: Dynamics of the Interaction of Subunits B and F in the A<sub>1</sub> A<sub>0</sub> ATP Synthase of *Methanosarcina mazei* Gö1. *Biochemistry* 49, 4181-4190.
- Röhl, A. (2010).** Reinigung und biochemische Charakterisierung der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATP-Synthase ATPase von *Ignicoccus hospitalis*. Diplomarbeit (Regensburg).
- Saum, R., Schlegel, K., Meyer, B., und Müller, V. (2009).** The F<sub>1</sub> F<sub>0</sub> ATP synthase genes in *Methanosarcina acetivorans* are dispensable for growth and ATP synthesis. *FEMS Microbiology Letters* 300, 230-236.
- Schäfer, G., und Meyering-Vos, M. (1992).** F-type or V-type? The chimeric nature of the archaeobacterial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1101, 232-235.
- Schäfer, I.B., Bailer, S.M., Düser, M.G., Börsch, M., Bernal, R.A., Stock, D., und Grüber, G. (2006).** Crystal structure of the archaeal A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATP synthase subunit B from *Methanosarcina mazei* Gö1: Implications of nucleotide-binding differences in the major A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> subunits A and B. *J. Mol. Biol.* 358, 725-740.
- Schägger, H. (2006).** Tricine–SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1, 16-22.
- Schägger, H., und Jagow, G. von (1991).** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199, 223-231.
- Schlegel, K., Leone, V., Faraldo-Gomez, J.D., und Muller, V. (2012).** Promiscuous archaeal ATP synthase concurrently coupled to Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 947-952.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., und Mann, M. (1996).** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- Sokolova, L., Wittig, I., Barth, H.-D., Schägger, H., Brutschy, B., und Brandt, U. (2010).** Laser-induced liquid bead ion desorption-MS of protein complexes from blue-native gels, a sensitive top-down proteomic approach. *Proteomics* 10, 1401-1407.
- Stark, H. (2010).** GraFix. In *Cryo-EM Part A Sample Preparation and Data Collection* (Elsevier), pp. 109–126.
- Szabo, Z., und Pohlschröder, M. (2012).** Diversity and Subcellular Distribution of Archaeal Secreted Proteins. *Front. Microbio.* 3.
- Thiede, B., Höhenwarter, W., Krah, A., Mattow, J., Schmid, M., Schmidt, F., und Jungblut, P.R. (2005).** Peptide mass fingerprinting. *Methods* 35, 237-247.
- Toei, M., Gerle, C., Nakano, M., Tani, K., Gyobu, N., Tamakoshi, M., Sone, N., Yoshida, M., Fujiyoshi, Y., und Mitsuoka, K., et al. (2007).** Dodecamer rotor ring defines H<sup>+</sup>/ATP ratio for ATP synthesis of prokaryotic V-ATPase from *Thermus hermophiles*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 20256-20261.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354.
- Trent, J.D. (1996).** A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in archaea. *FEMS Microbiology Reviews* 18, 249-258.
- Trent, J.D., Osipiuk, J., und Pinkau, T. (1990).** Acquired thermotolerance and heat shock in the extremely thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus* sp. strain B12. *J. Bacteriol.* 172, 1478-1484.

- Vonck, J., Nidda, T.K. von, Meier, T., Matthey, U., Mills, D.J., Kühlbrandt, W., und Dimroth, P. (2002).** Molecular Architecture of the Undecameric Rotor of a Bacterial Na<sup>+</sup>-ATP Synthase. *Journal of Molecular Biology* 321, 307-316.
- Vonck, J., Pisa, K.Y., Morgner, N., Brutschy, B., und Müller, V. (2009).** Three-dimensional Structure of A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATP Synthase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* by Electron Microscopy. *Journal of Biological Chemistry* 284, 10110-10119.
- Wakagi, T., und Oshima, T. (1985).** Membrane-bound ATPase of a thermoacidophilic archaebacterium, *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta* 817, 33-41.
- Walker, J.E. (2013).** The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1-16.
- Waters, E., Hohn, M.J., Ahel, I., Graham, D.E., Adams, M.D., Barnstead, M., Beeson, K.Y., Bibbs, L., Bolanos, R., und Keller, M., et al. (2003).** The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 12984-12988.
- Weigl, J. (2013).** Reinigung und Charakterisierung der ATP-Synthase aus *Ignicoccus islandicus*. Bachelorarbeit (Regensburg).
- Weinfurtner, A. (2012).** Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit bei der Reinigung der ATP-Synthase von *Ignicoccus hospitalis*. Bachelorarbeit (Regensburg).
- Welsh, D.T. (2000).** Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 263-290.
- Wiegmann, P. (2011).** Ionenabhängigkeit und Hemmstoffsensitivität der ATP-Synthase von *Ignicoccus hospitalis*. Bachelorarbeit (Regensburg).
- Wilms, R., Freiberg, C., Wegerle, E., Meier, I., Mayer, F., und Müller, V. (1996).** Subunit structure and organization of the genes of the A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATPase from the Archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Biol. Chem.* 271, 18843-18852.
- Wittig, I., und Schägger, H. (2005).** Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 5, 4338-4346.
- Woese, C.R., Kandler, O., und Wheelis, M.L. (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4576-4579.
- Wyschkony, I. (1998).** Ultrastrukturelle Untersuchungen an neuen Isolatzen aus dem Kolbeinsey-Gebiet (Island). Diplomarbeit (Regensburg).
- Yu, X., Goforth, C., Meyer, C., Rachel, R., Wirth, R., Schröder, G.F., und Egelman, E.H. (2012).** Filaments from *Ignicoccus hospitalis* Show Diversity of Packing in Proteins Containing N-Terminal Type IV Pilin Helices. *Journal of Molecular Biology* 422, 274-281.
- Zhang, C., Marcia, M., Langer, J.D., Peng, G., und Michel, H. (2013).** Role of the N-terminal signal peptide in the membrane insertion of *Aquifex aeolicus* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase c-subunit. *FEBS J* 280, 3425-3435.
- Zhang, Y.-J., Tian, H.-F., und Wen, J.-F. (2009).** The evolution of YidC/Oxa/Alb3 family in the three domains of life: a phylogenomic analysis. *BMC Evol Biol* 9, 137.
- Ziegler, A. (2014).** Aufreinigung und Charakterisierung der ATP-Synthase/ ATPase von *Ignicoccus pacificus*. Zulassungsarbeit (Regensburg).

## 7 Anhang

### A Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
AAA	ATPases associated with diverse cellular activities
AAM	acetone-acid-molybdate
Abb.	Abbildung
ABC	ATP binding cassette
AB-Mix	Acrylamid-Bisacrylamid-Mix
ACS	Acetyl-CoA-Synthetase
ADP	Adenosindiphosphat
AEX	anion exchange chromatography
AK	Antikörper
AMPSO	N-(1,1-Dimethyl-2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropanesulfonic acid
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B1/B2/B3	Bande 1/Bande 2/Bande 3
BBR	Bakterienbank Regensburg
BCA	bicinchoninic acid
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
CCD	charge-coupled device
CDC	cell division control
CNE	clear native electrophoresis
CoA	Coenzym A
CV	column volumes – Säulenvolumen
Cyt/Cy	Cytoplasma
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DDM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltopyranosid
DES	Diethylstilbestrol
DNA	desoxyribonucleic acid
DSM	DSMZ-Nummerierung der hinterlegten Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EM	Elektronenmikroskop(ie)

---

<i>et al.</i>	<i>et alii/ at aliae</i>
evtl.	eventuell
FA	Formaldehyd
FfM	Frankfurt am Main
g	Erdbeschleunigung
GA	Glutaraldehyd
ggf.	gegebenenfalls
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HMW	high molecular weight
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horse radish peroxidase
ICP	inductive coupled plasma
IgG	Immunglobulin G
Ihomp	<i>Ignicoccus hospitalis</i> outer membrane protein
IM	innere Membran
IMC	intermembrane compartment – Intermembrankompartiment
Inc.	Incorporated
K	Kontrolle
kDa	Kilodalton
LILBID	laser induced liquid bead ion desorption
Ltd.	Limited Company
Lys	Lysat
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
max.	maximal
Mbp	Megabasenpaare
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MnS	Membranen nach Solubilisierung
MS	Massenspektrometrie
mS	Millisiemens
MWCO	molecular weight cut-off
OCM	outer cellular membrane – äußere Zellmembran bei <i>Ignicoccus</i>
OG	n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid
ORF	open reading frame
P	Pellet
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSI	pounds per square inch
PSV	Protein-Seife-Verhältnis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rec	recombinant
RNA	ribonucleic acid

---

rRNA	ribosomale RNA
S	Svedberg
S <sup>0</sup>	elementarer Schwefel
SDS	sodium dodecyl sulfate
sek.	sekundär
S-layer	surface-layer
SME	synthetisches Meerwasser
sog.	so genannt
Sol	Solubilisat
sp./spec.	Spezies
SRed	H <sub>2</sub> :Schwefel-Oxidoreduktase
SRP	Signal Recognition Particle
syn	synthetic
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TBS-TT	Tris-buffered saline with Tween 20 and Triton X-100
TBT-Cl	Tributyltin-Chlorid
TBT/TBT-Oxid	Bis(tributyltin)oxid
TCA	trichloroacetic acid
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TMH	Transmembranhelix
TOF	time-of-flight
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethan
Ü	Überstand
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
v/v	volume per volume
WB	Western Blot
w/v	weight per volume
z.B.	zum Beispiel



## B Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Modelle der drei verschiedenen ATP-Synthase/ATPase-Klassen .....	2
Abb. 1.2 Ultradünnschnitt einer <i>I. hospitalis</i> -Zelle.....	7
Abb. 1.3 Schicht aus Tomogramm einer <i>N. equitans</i> -Zelle .....	9
Abb. 2.1 Probenauftrags- und Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie .....	25
Abb. 3.1 Relative ATPase-Aktivitäten in verschiedenen Lysepuffern mit bzw. ohne Glycerin nach Hemmung mit DCCD bzw. TBT-Oxid.....	43
Abb. 3.2 Saccharose-Dichtegradient von <i>I. hospitalis</i> (20 – 70 %) bei pH 8,0.....	44
Abb. 3.3 Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q HP) bei pH 8,0 .....	45
Abb. 3.4 Chromatogramm der Gelfiltrationschromatographie (Superose 6) bei pH 8,0.....	46
Abb. 3.5 CNE (5 – 13 %) der vereinigten Fraktionen aus den einzelnen Reinigungsschritten bei pH 8,0 .....	47
Abb. 3.6 SDS-PAGE und Western Blots (WB) der vereinigten Fraktionen der Gelfiltration bei pH 8,0 .....	48
Abb. 3.7 Saccharose-Dichtegradient von <i>I. hospitalis</i> (20 – 70 %) bei pH 9,0.....	49
Abb. 3.8 Relative ATPase-Aktivitäten in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration in verschiedenen Reaktionspuffern und bei verschiedenen pH-Werten.....	51
Abb. 3.9 Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q HP) bei pH 9,0 .....	53
Abb. 3.10 Chromatogramme der Gelfiltrationschromatographie (Superdex 200) bei pH 9,0. ....	54
Abb. 3.11 CNE des Reinigungsverlaufs bei pH 9,0 und Untereinheitenkomposition der angereicherten Proteinkomplexe.....	55
Abb. 3.12 SDS-PAGE nach Schägger (12 %) der vereinigten Fraktionen HiTrap I, Superdex I.1 und Superdex I.2.....	56
Abb. 3.13 SDS-PAGE nach Schägger (12 %) der vereinigten Fraktionen HiTrap II, Superdex II.1 und Superdex II.2.....	57
Abb. 3.14 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Probe HiTrap II .....	58
Abb. 3.15 CNE (5 – 13 %) der vernetzten (+) und unernetzten (-) Proben Solubilisat (Sol) und HiTrap II (II) .....	59
Abb. 3.16 Dot blot der Fraktionen der GraFix-Gradienten .....	60
Abb. 3.17 CNE und SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der GraFix-Gradienten .....	61
Abb. 3.18 CNE (5 – 13 %) der Fällungsfractionen aus bei 90°C gezüchteten Zellen .....	62
Abb. 3.19 Relative Aktivitäten des Solubilisats (Sol -DDM) sowie der bei 7,5 % (P 7,5) bzw. 12,5 % (P 12,5) gefällten Proteine in Anwesenheit der Hemmstoffe DCCD und TBT-Oxid .....	63
Abb. 3.20 CNE (5 – 13 %) der optimierten Fällungsfractionen aus bei 90°C gezüchteten Zellen .....	64
Abb. 3.21 Dot blot der Fällungsfractionen (P 2 – 8 und Ü 2 – 8) sowie des Solubilisats (Sol -DDM) als Kontrolle.....	64
Abb. 3.22 Saccharose-Dichtegradient (20 – 70 %) von bei 75°C gezüchteten Zellen .....	65
Abb. 3.23 CNE (5 – 13 %) mit Western Blots der Fällungsfractionen aus bei 75°C gezüchteten Zellen.....	66
Abb. 3.24 Dot blot der Fällungsfractionen (P 2 – 15 und Ü 2 – 15) sowie des Solubilisats (Sol -DDM) als Kontrolle.....	66
Abb. 3.25 SDS-PAGE nach Schägger (15 %) der Chloroform/Methanol-Extrakte von <i>I. hospitalis</i> .....	67
Abb. 3.26 Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q HP) von <i>I. pacificus</i> ..	70
Abb. 3.27 Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q HP) von <i>I. islandicus</i>	72
Abb. 3.28 CNE (5 – 13 %) der jeweils vereinten aktivsten Fraktionen von <i>I. hospitalis</i> , <i>I. pacificus</i> und <i>I. islandicus</i> , die bei 12,5 mS/cm vom Anionenaustauscher eluiert wurden .....	73
Abb. 3.29 Chromatogramme der Gelfiltrationschromatographie (Superdex 200) von <i>I. hospitalis</i> , <i>I. pacificus</i> und <i>I. islandicus</i> .....	74
Abb. 3.30 Saccharose-Dichtegradient (20 – 70 %) von Kin4/M (links) und Kin4/I (rechts) bei pH 8,0 .	76
Abb. 3.31 CNE der Solubilisate von Kin4/M und Kin4/I bei pH 8,0 sowie Untereinheitenkomposition der Proteinkomplexe aus Kin4/M .....	77

Abb. 3.32 SDS-PAGE nach Schägger (12 %) der Solubilisate von Kin4/M und Kin4/I bei pH 8,0 .....	78
Abb. 3.33 Chromatogramm der Gelfiltrationschromatographie (HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR) von Kin4/M bei pH 8,0.....	79
Abb. 3.34 Spezifische ATPase-Aktivitäten von Kin4/I und Kin4/M in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration im Reaktionspuffer .....	81
Abb. 3.35 Relative ATPase-Aktivität des Zellextraktes von Kin4/M in Abhängigkeit von der DCCD-Konzentration .....	82
Abb. 3.36 Saccharose-Dichtegradient von Kin4/M (20 – 70 %) bei pH 7,0 .....	83
Abb. 3.37 Chromatogramme der Anionenaustauschchromatographien (HiTrap Q HP) von Bande 2 (A) und Bande 3 (B) bei pH 7,0 .....	84
Abb. 3.38 Dot blot von Bande 2 und 3 aus dem Saccharosegradienten sowie deren Solubilisaten (Sol) und Membranen nach Solubilisierung (MnS) .....	85
Abb. 3.39 CNE (5 – 13 %) des Reinigungsverlaufs von Kin4/M bei pH 7,0.....	86
Abb. 3.40 SDS-PAGE nach Schägger (12 %) von Bande 2 und 3 bei pH 7,0 sowie deren gereinigten Fraktionen .....	87
Abb. 3.41 SDS-PAGE nach Schägger (15 %) der Chloroform/Methanol-Extrakte von Kin4/M (A) und <i>N. equitans</i> (B) .....	88

## C Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1 Spezifische ATPase-Aktivitäten in verschiedenen Lysepuffern .....	43
Tab. 3.2 Spezifische ATPase-Aktivitäten in verschiedenen Reaktionspuffern und bei verschiedenen pH-Werten.....	50
Tab. 3.3 N-terminale Aminosäuresequenzen der in Abb. 3.25 D markierten Banden aus <i>I. hospitalis</i> sowie der Untereinheit c (Igni_0682).....	68
Tab. 3.4 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Untereinheiten der ATP-Synthase/ATPase von <i>I. hospitalis</i> mit den entsprechenden Sequenzen verschiedener Organismen.....	69
Tab. D.1 Proteine aus <i>I. hospitalis</i> .....	123
Tab. D.2 Proteine aus <i>I. pacificus</i> .....	123
Tab. D.3 Proteine aus <i>I. islandicus</i> .....	124
Tab. D.4 Proteine aus <i>N. equitans</i> .....	125
Tab. E.1 MALDI-TOF Daten zu Abbildung 3.13 (Kap. 3.2.2.2).....	126
Tab. E.2 MALDI-TOF Daten zu Abbildung 3.41 (Kap. 3.6).....	127

## D Auflistung relevanter Proteine aus *I. hospitalis*, *I. pacificus*, *I. islandicus* und *N. equitans*

Im Folgenden sind für diese Arbeit relevante Proteine mit Angabe von Transmembranhelices und Signalpeptiden zusammengefasst.

Protein Nr. (Igni_)	Annotation/Funktion	MW (NCBI)	Transmembranhelices (TMHMM / Phobius)	Signalpeptid (Phobius)	Referenz
<b>ATP-Synthase/ATPase</b>					(Küper, 2010)
0609	Untereinheit a (I)	74,2	+ (7) / + (8)	-	
0679	Untereinheit B	52,2	- / -	-	
0680	Untereinheit D	25,0	- / -	-	
0682	Untereinheit c (K)	11,2	+ (3) / + (2)	+ (31 AS)	
1080	Untereinheit E	23,6	- / -	-	
1081	Untereinheit F	10,9	- / -	-	
1214	Untereinheit C	37,9	+ (1) / + (1)	-	
1215	Untereinheit H	12,7	- / -	-	
1305	Untereinheit A	66,6	- / -	-	
<b>Hydrogenase</b>					(Giannone et al., 2011)
1366	kleine Untereinheit	41,6	- / + (1)	+ (32 AS)	
1367	große Untereinheit	74,1	- / -	-	
1368	Transmembranprotein	30,9	+ (5) / + (7)	-	
1369	4Fe-4S Ferredoxin	54,3	- / -	-	
<b>putative Schwefelreduktase</b>					(Giannone et al., 2011)
0528	Polysulfidreduktase NrfD	52,8	+ (10) / + (12)	-	(Heimerl, 2014)
0529	Sulfidreduktase, Untereinheit B	40,1	- / -	-	(Nass et al., 2014)
0530	Cytochrom	20,9	+ (2) / + (1)	+ (31 AS)	(Nass et al., 2014)
0801	4Fe-4S Ferredoxin	24,2	- / -	-	
0802	Molybdopterin Oxidoreduktase	92,4	- / -	-	
0803	hypothetisches Protein	31,8	+ (8) / + (7)	+ (18 AS)	

**Cytochrome**

0759	putatives Cytochrom c	19,5	- / -	+ (22 AS)	
0955	Cytochrom c	58,2	- / -	+ (34 AS)	(Nass et al., 2014)
1052	putatives Cytochrom c	21,7	+ (1) / + (1)	+ (20 AS)	
1130	putatives Cytochrom c	55,9	+ (2) / + (1)	+ (31 AS)	
1359	Cytochrom c	70,8	- / -	+ (21 AS)	(Nass et al., 2014)

**Acetyl-CoA-Synthetase (ACS)**

(Mayer, 2008)

0256	AMP-abhängige Synthetase/Ligase	47,2	- / -	-	
0257	Acyl-CoA Synthetase	25,6	- / -	-	

**Thermosom**

0096	Thermosom	60,4	- / -	-	(Burghardt et al., 2008)
0897	Thermosom	58,7	- / -	-	(Mayer, 2008)

**in Membranpräparationen identifizierte Proteine mit bekannter Funktion**

0174	DNA/RNA-Bindeprotein albA	10,6	- / -	-	(Giannone et al., 2011)
0670	Fiberprotein (Zellanhang)	30,8	+ (2) / + (1)	-	(Müller et al., 2009)
0693	AAA ATPase	82,1	- / -	-	(Heimerl, 2014)
0872	PhoH family Protein	43,0	- / -	-	(Giannone et al., 2014)
1085	ABC Transporter	27,4	- / -	-	
1266	lhomp1	8,3	+ (1) / + (1)	-	(Burghardt et al., 2007)
1378	Nitratreduktase, Untereinheit G	33,5	- / -	+ (25 AS)	(Podar et al., 2008)
1389	Lysinexporterprotein LysE/YggA	21,1	+ (6) / + (5)	+ (27 AS)	
1431	AAA ATPase	81,9	- / -	-	(Heimerl, 2014)

## in Membranpräparationen identifizierte hypothetische Proteine

0404	hypothetisches Protein	8,9	+ (1) / + (1)	-	
0524	hypothetisches Protein	17,4	- / -	-	
0533	hypothetisches Protein; Clp-protease-like superfamily	32,0	- / -	+ (22 AS)	
0541	hypothetisches Protein mit WD-40-Domäne	52,5	- / -	-	(Heimerl, 2014)
0798	hypothetisches Protein	5,6	+ (1) / + (1)	-	
1016	hypothetisches Protein	4,4	+ (2) / + (1)	+ (19 AS)	
1033	hypothetisches Protein	5,6	+ (2) / + (1)	+ (30 AS)	
1161	hypothetisches Protein	4,6	+ (2) / + (1)	+ (17 AS)	
1190	hypothetisches Protein	40,4	- / + (1)	-	

Tab. D.1 Proteine aus *I. hospitalis*

Protein Nr. (lpa_)	Annotation/Funktion	MW (IMG)	Transmembranhelices (TMHMM / Phobius)	Signalpeptid (Phobius)
--------------------------	---------------------	-------------	--	---------------------------

## ATP-Synthase/ATPase

00037	Untereinheit B	52,2	- / -	-
00038	Untereinheit D	24,9	- / -	-
00040	Untereinheit c (K)	10,8	+ (3) / + (3)	-
00133	Untereinheit C	38,7	- / + (1)	-
00164	Untereinheit A	66,2	- / -	-
00278	Untereinheit a (I)	77,2	+ (7) / + (8)	-
01621	Untereinheit F	11,3	- / -	-
01622	Untereinheit E	24,0	- / -	-

## Hydrogenase

00097	kleine Untereinheit	45,2	- / + (1)	+ (32 AS)
00098	große Untereinheit	72,3	- / -	-
00099	hypothetisches Protein	31,1	+ (7) / + (7)	-
00100	Fe-S Oxidoreduktase	53,3	- / -	-

Tab. D.2 Proteine aus *I. pacificus*. Die Gennummern sind Teil der vorläufigen Annotierung und können noch verändert werden.

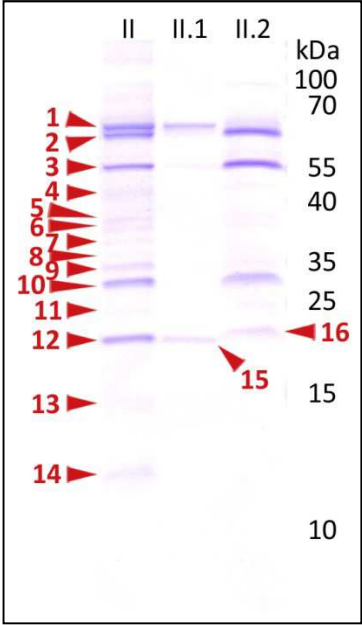
Protein Nr. (lis_)	Annotation/Funktion	MW (IMG)	Transmembranhelices (TMHMM / Phobius)	Signalpeptid (Phobius)
<b>ATP-Synthase/ATPase</b>				
00489	Untereinheit A	65,9	- / -	-
00578	Untereinheit C	38,9	- / -	-
00897	Untereinheit c (K)	10,8	+ (3) / + (2)	+ (31 AS)
00899	Untereinheit D	24,8	- / -	-
00900	Untereinheit B	53,3	- / -	-
00950	Untereinheit a (I)	74,8	+ (7) / + (7)	-
01014	Untereinheit F	11,2	- / -	-
01015	Untereinheit E	23,9	- / -	-
<b>Hydrogenase</b>				
00059	kleine Untereinheit	45,6	+ (1) / + (1)	+ (31 AS)
00060	große Untereinheit	72,4	- / -	-
00061	hypothetisches Protein	30,7	+ (7) / + (7)	-
00062	Fe-S Oxidoreduktase	54,4	- / -	-

**Tab. D.3 Proteine aus *I. islandicus*.** Die Gennummern sind Teil der vorläufigen Annotierung und können noch verändert werden.

Protein Nr. (NEQ)	Annotation/Funktion	MW (NCBI)	Transmembranhelices (TMHMM / Phobius)	Signalpeptid (Phobius)	Referenz
<b>ATP-Synthase/ATPase</b>					(Waters et al., 2003)
103	Untereinheit A	64,6	- / -	-	
166	Untereinheit D	23,5	- / -	-	
217	Untereinheit c (K)	6,8	+ (2) / + (1)	+ (34 AS)	
263	Untereinheit B	46,5	- / -	-	
410	Untereinheit a (I)	53,7	+ (6) / + (6)	-	
<b>in Membranpräparationen identifizierte Proteine mit bekannter Funktion</b>					
236	S-Layer-assoziiertes Protein	37,9	+ (2) / + (1)	+ (20 AS)	(Burghardt et al., 2009)
300	S-Layer-Protein	103,8	- / -	+ (22 AS)	(Burghardt et al., 2009)
<b>in Membranpräparationen identifizierte hypothetische Proteine</b>					
035	hypothetisches Protein	51,9	+ (1) / + (1)	+ (16 AS)	(Giannone et al., 2011); (Gürster, 2007)
153	hypothetisches Protein	10,6	+ (1) / + (1)	-	
222	hypothetisches Protein	73,7	+ (8) / + (7)	+ (20 AS)	(Giannone et al., 2011)
330	hypothetisches Protein	35,8	+ (1) / + (1)	-	
444	hypothetisches Protein	27,2	+ (1) / + (1)	-	

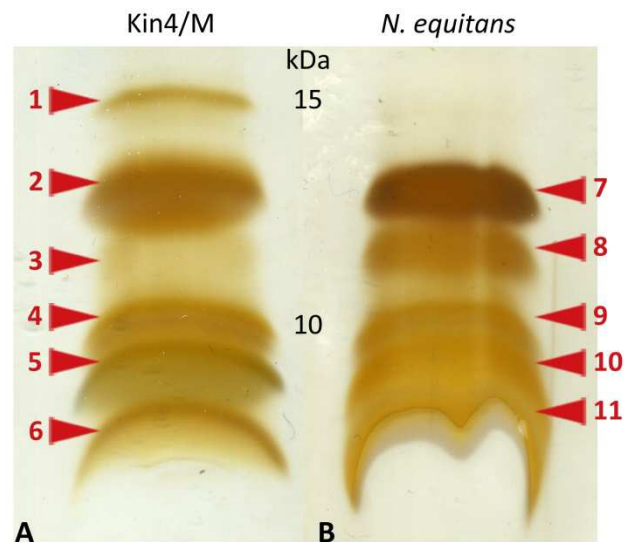
Tab. D.4 Proteine aus *N. equitans*

## E Daten aus Analysen mittels MALDI-TOF MS/MS

#	Accession No.	1st hit	score	2nd hit	score	3rd hit	score
1	gi 156937402	V-type ATP synthase subunit I = <b>a</b>	621				
2	gi 156938092	V-type ATP synthase subunit <b>A</b>	694				
3	gi 156937472	V-type ATP synthase subunit <b>B</b>	1070				
4	gi 156937334	hypothetical protein Igni_0541	169				
5	gi 156937978	hypothetical protein Igni_1190	567				
6	gi 156937322	sulfide reductase subunit B	210				
7	gi 156938001	hypothetical protein Igni_1214 = <b>C</b>	379				
8	gi 156937266	ABC tungstate transporter permease component-like protein	69				
9	gi 156937463	hypothetical protein Igni_0670 = fibers	133				
10	gi 156937326	hypothetical protein Igni_0533	553				
11	gi 156937873	ABC transporter	316				
12	gi 156937868	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase subunit <b>E</b>	105	V-type ATP synthase subunit <b>D</b>	96		
13	gi 156937317	hypothetical protein Igni_0524	355				
14	gi 156936969	DNA/RNA-binding protein albA	140	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase, C subunit = <b>c</b>	129	hypothetical protein Igni_1215 = <b>H</b>	96
15	gi 156937868	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase subunit <b>E</b>	169	V-type ATP synthase subunit <b>D</b>	45		
16	gi 156937473	V-type ATP synthase subunit <b>D</b>	75				

**Tab. E.1 MALDI-TOF Daten zu Abb. 3.13 (Kap. 3.2.2.2).** Alle identifizierten Proteine stammen aus *I. hospitalis*; zweite und dritte Treffer sind nur angegeben, sofern sie relevant sind; die Accession No. bezieht sich jeweils auf den ersten Treffer





#	Accession No.	1st hit	score	2nd hit	score	3rd hit	score
1	gi 156938185	lysine exporter protein LysE/YggA	323				
2	gi 156937475	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase, C subunit = c	216	hypothetical protein Igni_0798	73		
3	gi 156937591	hypothetical protein Igni_0798	85	hypothetical protein Igni_1161	65		
4	gi 156938053	hypothetical protein Igni_1266 = lhomp1	122	hypothetical protein Igni_0798	69	hypothetical protein Igni_0404	68
5	gi 156938053	hypothetical protein Igni_1266 = lhomp1	532	hypothetical protein Igni_0404	120		
6	gi 41615011	hypothetical protein NEQ217 = c	599	hypothetical protein Igni_1266 = lhomp1	251		
7	gi 119872108	major facilitator transporter (Pis)	48	hypothetical protein Igni_1033	47		
8	gi 20090254	3-isopropoylmalate dehydratase (Mac)	52	sugar (pentulose and hexulose) kinase (Dka)	46	hypothetical protein Igni_1161	46
9	gi 156938053	hypothetical protein Igni_1266 = lhomp1	78				
10	gi 156938053	hypothetical protein Igni_1266 = lhomp1	176	hypothetical protein Igni_1016	127		
11	gi 156938053	hypothetical protein Igni_1266 = lhomp1	228	proton/glutamate symporter (Ton)	77	hypothetical protein NEQ217 = c	74

**Tab. E.2 MALDI-TOF Daten zu Abb. 3.41 (Kap. 3.6).** Proteine stammen aus *I. hospitalis*, falls nicht anders angegeben (Dka = *Desulfurococcus kamchatkensis*; Mac = *Methanosarcina acetivorans*; NEQ = *N. equitans*; Pis = *Pyrobaculum islandicum*; Ton = *Thermococcus onnurineus*); zweite und dritte Treffer sind nur angegeben, sofern sie relevant sind; die Accession No. bezieht sich jeweils auf den ersten Treffer

## F Publikationen

Huber, H., **Kreuter, L.** (2014). Nanoarchaeota. In The Procaryotes – Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea. E. Rosenberg et al., eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Naß, B., Pöll, U., Langer, J., **Kreuter, L.**, Küper, U., Flechsler, J., Heimerl, T., Rachel, R., Huber, H., Kletzin, A. (2014). Three Multiheme Cytochromes c from the Hyperthermophilic Archaeon *Ignicoccus hospitalis*: Purification, Properties and Localization. *Microbiology*, *160*, 1278 – 1289

## G Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

**Prof. Dr. Reinhard Rachel**, nicht nur für die Begutachtung dieser Arbeit sondern auch für die vielen Anregungen und Diskussionen in den IgNi-Nano-Seminaren und nicht zuletzt für die Möglichkeit, mit ihm am EM nach meinen ATPasen suchen zu dürfen.

**Dr. Harald Huber** für dieses spannende Thema (auch wenn es mich manchmal verzweifeln ließ) und die hervorragende Betreuung über all die Jahre, für die vielen guten Ratschläge und die Diskussionen, das Vertrauen in meine Fähigkeiten und dass er mir die Wissenschaft ein Stück näher gebracht hat.

**Prof. Dr. Michael Thomm** für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen und die Begleitung als Supervisor.

**Prof. Dr. Volker Müller**, der immer für Fragen hinsichtlich ATPasen zur Verfügung stand, für die vielen Anregungen und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe Versuche zur Isolierung der c-Untereinheiten durchzuführen und darüber hinaus für die Begleitung dieser Arbeit als Supervisor und Gutachter.

**Prof. Dr. Reinhard Wirth** für die Diskussionen im Rahmen der IgNi-Nano-Seminare und das Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung von Bärlauchpesto und Hosi.

**Prof. Dr. Christine Ziegler** für hilfreiche Tipps und Anregungen, die generelle Bereicherung der IgNi-Nano-Seminare sowie das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit und nicht zuletzt für die vielen ‚Kurierfahrten‘ zwischen Regensburg und Frankfurt.

**Dr. Janet Vonck** und **Dr. Guohong Peng** für die Versuche, die ATP-Synthase/ATPase im EM sichtbar zu machen bzw. zu kristallisieren und für angeregte Diskussionen.

**Thomas Hader** und **Konrad ‚Koni‘ Eichinger** für die Unterstützung bei den vielen Fermentationen.

**Elisabeth Nagelfeld**, die ‚gute Seele im Sekretariat‘, die auch immer für einen Ratsch oder zum Milchreis essen da war.

Dem gesamten Huber Labor: **Gabi Leichtl**, die ‚gute Seele im Labor‘ für die vielen lustigen Stunden und die ganzen Kleinigkeiten im Laboralltag; **Vroni Menath** für schöne Gespräche, Klamottenanproben und Farbberatung; **Steffi Daxer** und **Pia Wiegmann** für die schöne Zeit im und außerhalb vom Labor; meinem Vorgänger **Dr. Ulf Küper**, der mich in das Thema ATPasen eingelernt hat sowie meiner Mit-Diplomandin **Catrin Wartner** und den ehemaligen Studenten **Andrea Weinfurtner**, **Alex Ziegler**, **Juli Weigl**, **Kristina Plobner** und **Anni Eben**.

**Florian Mayer** für die gute Zusammenarbeit und dem gesamten Müller Labor für die freundliche Aufnahme während meiner Zeit dort.

Den ‚Rachels‘: **Jenny Flechsler**, **Dr. Thomas Heimerl** und **Vroni Heinz** für die gute Zusammenarbeit, Diskussionen im großen wie im kleinen Rahmen und Unterstützungen in EM-Fragen.

Dem gesamten **Lehrstuhl Mikrobiologie**, der dazu beigetragen hat, dass die letzten 4 Jahre mit Sicherheit unvergesslich bleiben werden und der den Abschied echt schwer macht.

Meinen **Freunden**: den Regensburgern, dank denen ich hier eine zweite Heimat gefunden habe; den Münchnern, dank denen ich immer wieder gerne nach Hause zurückkomme; und den Amis, dank denen es mich immer wieder über den Atlantik zieht.

Zu guter Letzt danke ich meiner Mutter **Sybille Schmidt-Kreuter**, die mich immer bedingungslos unterstützt hat und für mich da war und ohne die ich nicht das wäre, was ich heute bin; meiner Schwester **Vera** für die richtigen Fragen und Kommentare zur richtigen Zeit und ein offenes Ohr auch in schwierigen Zeiten; und **Klaus Breithaupt** für seine Unterstützung über all die Jahre.

